

# Optimierung der präparativen Herstellung von rekombinantem humanem Cathepsin L

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Anja Paul,  
geboren am 28.02.1983 in Gera

Gutachter:

1. Prof. Dr. Bernd Wiederanders  
Institut für Biochemie, FSU Jena
2. Prof. Dr. med. habil. Dieter Müller  
Institut für Pharmakologie und Toxikologie, FSU Jena
3. Dr. Dieter Brömme  
Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of British Columbia  
Vancouver

Tag der öffentlichen Verteidigung: 25. Oktober 2007

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>2</b>
<b>3.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
<b>4.</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>11</b>
4.1	Materialien	11
4.1.1	Enzyme, Reagenzien, Antibiotika, Standards, Substanzen, Medien, Puffer	11
4.1.2	Reagenziensätze zur Bearbeitung von DNA	13
4.1.3	Vektoren und Bakterienstämme	13
4.1.4	Geräte	15
4.1.5	Computerprogramme	16
4.2	Methoden	17
4.2.1	Molekularbiologische Methoden	17
4.2.2	Proteinchemische Methoden	23
4.2.3	Enzymanalytik	26
4.2.4	Hydrophobe Interaktionschromatographie	33
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
5.1	Expression des humanen Procathepsin L in E.coli	34
5.2	Heterokatalytische analytische Prozessierung von Procathepsin L	45
5.3.	Renaturierung von Procathepsin L	50
5.4	Reinigung von renaturiertem Procathepsin L durch hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)	63
5.5	Autokatalytische präparative Prozessierung von Procathepsin L	68
5.6	Bilanzierung der Herstellung des Cathepsin L	71
5.7	Charakterisierung des hergestellten Procathepsin L bzw. Cathepsin L	72
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>77</b>

## **Literaturverzeichnis**

## **Danksagung**

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

## **Lebenslauf**

## 1. Abkürzungsverzeichnis

AMC	7-Amino-4-methylcumarin
Arg	Arginin
bp	Basenpaare
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	desoxy Nucleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FE	Fluoreszenzeinheiten
GndHCl	Guanidinhydrochlorid
GSH	Glutathionsulfhydryl
GSSG	Glutathiondisulfid
His	Histidin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-galactopyranoside
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
$K_i$	Dissoziationskonstante eines Enzym-Inhibitor-Komplexes
$K_M$	Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes
LB	Luria Bertoni
MALDI	Matrix-unterstützte Laser Desorptions-Ionisations-Massenspektroskopie
MHC	major histocompatibility complex
MMTS	Methyl-Methanthiosulfonat
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase chain reaction
Phe	Phenylalanin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylenediamine
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Z	Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe

## 2. Zusammenfassung

Cathepsin L ist ein Vertreter der Cysteinproteasen der Papain-Superfamilie und Namensgeber der Cathepsin L-ähnlichen Unterfamilie. Seit der Erstbeschreibung sind zahlreiche physiologische und pathologische Funktionen bekannt, z.B. die Beteiligung an proteolytischen Prozessierungsvorgängen bei der Immunantwort, an der Homöostase von Epithel und Haarfollikeln sowie an der Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie und der Arteriosklerose. Neben diesen klinisch relevanten Aspekten hat Cathepsin L, wie die anderen Enzyme der Papain-Superfamilie, die biochemische Eigenschaft, dass es als Proenzym synthetisiert wird. Seine Aktivität ist vor Erreichen des Wirkorts durch eine Proregion blockiert. Diese Proregion ist multifunktionell und dient neben der Inhibition auch der Stabilisierung, Zielsteuerung und Faltungskatalyse des Mutterenzyms. Die genannten Funktionen sind schon für zahlreiche Mitglieder der Cathepsin L-Unterfamilie nachgewiesen und charakterisiert worden. Da in dieser Unterfamilie weder die Strukturen der reifen Enzyme noch die der Proregionen erheblich differieren, waren Untersuchungen zur Spezifität der genannten Funktionen naheliegend. Bezüglich der inhibitorischen Funktion ergab sich in zahlreichen Untersuchungen, dass die Kreuzreaktivität mit zunehmender evolutionärer Distanz abnimmt. Welche strukturellen Interaktionen dafür verantwortlich sind, ist nicht bekannt. Zur Spezifität der Foldasewirkung gibt es noch keine systematischen Untersuchungen, lediglich je ein *cis*- und *trans*-Über-Kreuz-Experiment mit Cathepsin L und Aleurain bzw. Cathepsin K und S, die für eine absolute Spezifität sprechen, wurden publiziert. Die letztgenannten Befunde stammen aus der eigenen Arbeitsgruppe und sollten durch weitere Über-Kreuz-Experimente unter Einbeziehung von Cathepsin L und seinem Propeptid ergänzt werden, d.h. die denaturierten Enzyme sollten in Gegenwart des eigenen bzw. zahlreicher fremder Propeptide in sogenannten *trans*-Experimenten renaturiert werden. Dazu mussten das Propeptid und das reife Cathepsin L als rekombinante Proteine hergestellt werden, letzteres war meine Aufgabe. Meine experimentelle Arbeit bestand in der Expression des rekombinanten Proenzyms in *E.coli*, der Optimierung der Rückfaltung, der Reinigung und der autokatalytischen Prozessierung. Das reife Enzym habe ich bezüglich Funktion und Hantierbarkeit umfassend charakterisiert.

Die Expression in *E.coli* führte zur Bildung von Einschlusskörperchen, für deren Aufarbeitung ein Standardprotokoll vorlag. Ich konnte zeigen, dass die zur Feinreinigung empfohlene Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation in diesem Fall keine Steigerung der Reinheit bringt. Mein vereinfachtes Verfahren reduzierte den Arbeitsaufwand und vergrößerte

die Ausbeute. Die Einschlusskörperchen wurden denaturierend aufgelöst und Procathepsin L anschließend nach dem Verdünnungsprinzip renaturiert. Zur Optimierung der Renaturierungsbedingungen untersuchte ich 17 Parameter mit faktoriellen Versuchsplänen, ein überdurchschnittlicher Aufwand, der sich aber gelohnt hat: Eine 3 stündige Inkubation bei 19°C in 0,192 mM TRIS pH 8,2 / 8,35 mM GSH / 7,4 mM GSSG / 0,4 M MgCl<sub>2</sub> / 0,07% Brij / 2mM EDTA führte zu einer Renaturierungsausbeute von 75%. Zur nachfolgenden Reinigung und Konzentrierung wurde die hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) genutzt, deren Bedingungen an die speziellen Eigenschaften des Procathepsin L angepasst wurden. Die präparative Prozessierung des Procathepsin L zum reifen Enzym erfolgte autokatalytisch. Die Reaktionsbedingungen dieses letzten Schrittes bei der Cathepsin L-Herstellung habe ich so weit optimiert (pH 3,5, 30 Minuten Inkubation bei 37°C), dass sowohl eine Wiederfindung von etwa 100% als auch die proteolytische Zerstörung aller in der Elektrophorese erkennbaren Fremdproteine erreicht werden konnten. Da ich die Prozessierung jeder der von mir hergestellten Chargen durch eine rasche Folge von Aktivitätsmessungen überwachte, kam ich zu einem Satz von kinetischen Daten, dessen mathematische Auswertung einen überraschenden Nebenbefund ergab: Cathepsin L katalysiert seine eigene Bildung aus der Proform mit etwa der gleichen Spezifitätskonstante ( $k_{\text{cat}}/K_M$ ) wie die Hydrolyse seiner besten Peptidsubstrate.

Nach jedem der eben beschriebenen Schritte wurden Enzymaktivität und Gesamtprotein bilanziert. Mithilfe des hochaffinen Inhibitors E64 wurde außerdem der Prozentsatz an aktivem Enzym titriert. Die beste Ausbeute lag bei 13 mg Cathepsin L aus 2,4 l Bakterienkultur, mit einem Anteil an aktivem Enzym von 57%.

Die abschließende Charakterisierung des Enzymproteins bezüglich Molekulargewicht (MALDI-TOF) und Prozessierungsstelle (N-terminale Aminosäuresequenzanalyse durch Edman-Abbau) ergab Übereinstimmung mit der Datenbanksequenz. Die kinetischen Daten des Enzyms für das Substrat Z-Phe-Arg-AMC ( $K_M$  (1,414  $\mu\text{M}$ ) und  $k_{\text{cat}}$  (51,23  $\text{s}^{-1}$ ) lagen im Bereich der Literaturwerte. Im Gegensatz zu Enzympräparationen aus menschlichem Gewebe ist das rekombinante Enzym so stabil, dass ein Zusatz reversibler Inhibitoren (z.B. Hg oder MMTS) zur Blockierung der SH-Gruppe im katalytischen Zentrum überflüssig ist.

Das hergestellte Cathepsin L wird in der eigenen Arbeitsgruppe seit einem Jahr erfolgreich zu Untersuchungen der Foldasespezifität in Über-Kreuz-Versuchen mit den Cathepsinen S und K und ihren Propeptiden eingesetzt und auch in einem wissenschaftlichen Kooperationsprojekt zur Entwicklung spezifischer Inhibitoren verwendet.

### 3. Einleitung

Cathepsine sind lysosomale Cysteinproteasen der Papain-Superfamilie, die über die für diese Enzymfamilie charakteristische dreidimensionale Struktur aus zwei etwa gleich großen Domänen und der zentralen Substratbindungsstelle mit dem aktiven Zentrum verfügen. Die Papain-Familie umfasst gegenwärtig drei Unterfamilien, Cathepsin L-ähnliche (z.B. Cathepsin L, K, S und H), Cathepsin F-ähnliche (Cathepsin F und W) und Cathepsin B-ähnliche Proteasen. Cathepsin X scheint mit Cathepsin B verwandt zu sein, wird aber bisher keiner Unterfamilie zugeordnet. Die Unterteilung in diese drei Familien beruht auf der Größe und Struktur der Proregion (Karrer et al. 1993, Wang et al. 1998, Wex et al. 1999). Cathepsin L und die anderen Mitglieder dieser Unterfamilie sind durch eine etwa 100 Aminosäuren lange Proregion charakterisiert. Cathepsin X verfügt mit 38 Aminosäuren über die kürzeste, Cathepsin F über die längste (251 Aminosäuren) Proregion. Die große strukturelle Ähnlichkeit resultiert aus einer engen genetischen Verwandtschaft. Aufgrund ihrer chromosomalen Lokalisation, die Cathepsine L und V liegen auf Chromosom 9q21, die Cathepsine S und K auf Chromosom 1q21 und Cathepsin F und W auf Chromosom 11q14, wird angenommen, dass sie während der Evolution durch Genduplikation entstanden sind. Eine eigene Chromosomenlokalisierung wurde für die Cathepsine B (8p22-23), H (15q24-25) und X (20q13) gefunden (Turk et al. 2000).

Wie alle Cysteinproteasen wird Cathepsin L als inaktives Prä-Proenzym von membranständigen Ribosomen synthetisiert. Die Präsequenz dirigiert das Enzym ins Lumen des Endoplasmatischen Retikulums und wird anschließend sofort abgespalten. Die Prosequenz verbleibt zwischen den beiden Domänen des reifen Enzyms und blockiert so den Zugang des Substrates zum aktiven Zentrum. Das verhindert eine unkontrollierte Proteolyse, die fatale Folgen haben könnte. Da die Orientierung der Proregion entgegengesetzt zum Substrat ist, kann das katalytische Zentrum nicht angreifen, und es erfolgt keine Hydrolyse. Die Prozessierung des Zymogens zum aktiven Enzym erfolgt auf dem Weg zu den Lysosomen durch Abspaltung der Proregion. In den Transportvesikeln sinkt der pH, und die damit verbundene Konformationsänderung macht den Inhibitor zum Substrat. Dieser autokatalytische Weg der Aktivierung ist bei Cathepsin L (Turk et al. 2001), aber auch bei den Cathepsinen B und S sehr gut untersucht (Quraishi et al. 2001). Anders ist das beispielsweise beim Cathepsin C, dessen Proregion durch die Cathepsine L oder S abgespalten wird, also nicht durch Autokatalyse (Dahl et al. 2001).

Bei Säugetieren wurden Cysteinproteasen zuerst in den Lysosomen gefunden und gehören damit zu den Cathepsinen, die für den unspezifischen intrazellulären Proteinkatabolismus verantwortlich sind. Die meisten Cathepsine sind Endopeptidasen (z.B. Cathepsin L, S und K); es kommen jedoch auch Amino- (z.B. Cathepsin H) und Carboxypeptidasen (z.B. Cathepsin B und X) vor. Inzwischen sind aber auch zahlreiche spezifische Funktionen dieser Proteasen entdeckt worden.

Cathepsin K zum Beispiel ist die einzige Protease, die in der Lage ist, tripelhelikales Kollagen zu spalten, das in Fibroblasten produziert wird und die organische Knochenmatrix bildet. Cathepsin K wird mit Sicherheit in Osteoklasten, vermutlich aber auch in einigen anderen Zellen exprimiert (Brömme und Okamoto 1995, Everts et al. 2003, Drake et al. 1996) und ist am Knochenumbau beteiligt. Mutationen im Cathepsin K-Gen führen unter anderem zu Pyknodysostose, einer seltenen Knochenbildungsstörung, und anderen Skelett-Dysplasien (Gelb et al. 1996; Hou, Brömme et al. 1999; Fujita et al. 2000).

Cathepsin S wurde in hoher Konzentration in den lymphatischen Organen gefunden und hat Bedeutung bei der Antigenpräsentation über den MHC II-Komplex (Shi et al. 1999, Villadangos et al. 1999, Riese et al. 1996), aber auch bei der Angiogenese im Rahmen der Wundheilung (Shi, Sukhova et al. 2003).

Cathepsin L wird ubiquitär konstitutiv exprimiert und ist entscheidend am lysosomalen Proteinkatabolismus beteiligt. Es katalysiert dort aber auch spezifische proteolytische Prozessierungsvorgänge bei der Immunantwort, z.B. die Herstellung der Peptide zur Beladung der MHC-Klasse-II-Moleküle und des MHC-Klasse-I Moleküls CD1D (Honey, Rudensky 2003). Cathepsin L spielt damit auch eine entscheidende Rolle bei der positiven Selektion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die durch Interaktion der T-Zell-Rezeptoren mit MHC-II-Komplex-gebundenen Peptiden an kortikalen Thymusepithelzellen geschieht. Deshalb zeigen Cathepsin L-defiziente Zellen eine verminderte CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Selektion (Honey, Nakagawa et al. 2002) und in Folge dessen eine verminderte Zahl peripherer CD4<sup>+</sup>-Thymozyten (Lombardi et al. 2005). Auch die CD1D-Antigenpräsentation gegenüber Natürlichen Killerzellen, die einen speziellen T-Zell-Rezeptor exprimieren, ist bei Cathepsin L-defizienten Mäusen gestört, sie haben eine stark verminderte Anzahl an Natürlichen Killerzellen (Honey, Benlagha et al. 2002). Des Weiteren katalysiert Cathepsin L, v.a. in Thymusepithelzellen die Degradation der Invarianten Kette, der sogenannten Ii-Kette, die die Voraussetzung für die Bindung der Peptide an MHC-II-Moleküle und den anschließenden Transport der Peptid-MHC-II-Komplexe an die Zelloberfläche darstellt (Wolf und Ploegh 1995, Roche und Cresswell 1990, Tolosa et al. 2003).



In der Haut beeinflusst Cathepsin L die Homöostase von Epidermis und Haarfollikeln. Cathepsin L-Knock-out-Mäuse litten unter schubweise progressivem Haarverlust, der nach dem neunten Lebensmonat in einer extensiven Alopezie endete (Potts et al. 2004). Histologische Analysen der Haut solcher Cathepsin L-defizienten Tiere zeigten vor allem eine diffuse epitheliale Hyperplasie infolge Hyperproliferation basaler Keratinozyten. Sie resultiert aus einem verstärkten Recycling von Wachstumsfaktoren und derer Rezeptoren aus den Endosomen zur Plasmamembran dieser Zellen (Reinheckel et al. 2005). Die Expression von Cathepsin V, einer kürzlich identifizierten humanen Cathepsin L-ähnlichen Protease, kann diese Fehlregulation in Cathepsin L-defizienten Tieren kompensieren (Hagemann et al. 2004). Des Weiteren ist Cathepsin L ein Regulator der Melanozyten-Differenzierung und somit der Hautpigmentierung (Tobin et al. 2002) und es scheint auch eine Rolle bei der Entstehung psoriatischer Hautveränderungen zu spielen (Kawada et al. 1997).

Yu et al. (2005) verglichen Myokardgewebe von Patienten, die aufgrund einer fortgeschrittenen dilatativen Kardiomyopathie einer orthotopen Herztransplantation unterzogen wurden, mit normalem Herzgewebe und fanden heraus, dass die Expression von Cathepsin L und der Cathepsin L-mRNA im pathologisch veränderten Herzgewebe markant erhöht war. Die Cathepsin L-mRNA-Konzentration korreliert signifikant negativ mit der Ejektionleistung des Myokards.

Untersuchungen an transplantierten Nieren im Endstadium einer chronischen Abstoßungsreaktion zeigten signifikant erhöhte intraglomeruläre Cathepsin L- und Cathepsin B-Aktivitäten (Paczek et al. 1994). Im Tierversuch verringerte die Verabreichung von E64 bzw. Z-Phe-Tyr(O-t-butyl)CHN<sub>2</sub>, einem spezifischen Inhibitor von Cysteinproteasen mit hoher Selektivität gegenüber Cathepsin L, eine durch Antikörper gegen glomeruläre Basalmembranen induzierte Proteinurie (Baricos, Cortez et al. 1991; Baricos, O'Connor et al. 1988). Cathepsin L und andere Cysteinproteasen scheinen also eine Rolle als Mediatoren des glomerulären Schadens zu spielen.

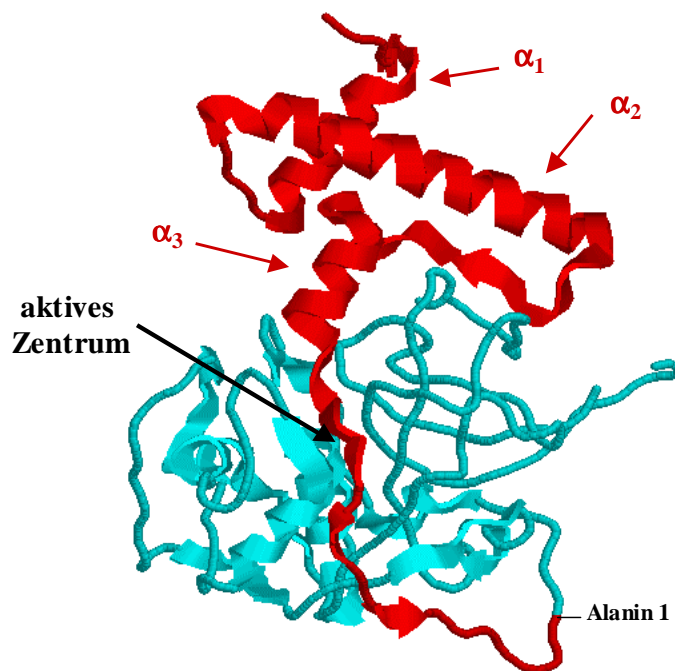
Cathepsin L scheint auch eine Rolle beim Knochen turnover unter physiologischen und pathologischen Bedingungen zu spielen. Experimente mit Cathepsin L-Knock-out-Mäusen haben gezeigt, dass das trabekuläre Knochenvolumen gegenüber dem Wildtyp signifikant vermindert ist (Potts et al. 2004). Bei Menschen mit Osteoporose war der Cathepsin L-Serumspiegel gegenüber dem Serum von Kontrollpersonen erhöht und sank unter der Behandlung signifikant ab (Lang, Willinger et al. 2004). Juvenile, idiopathische Arthritis sowie rheumatoide Arthritis sind durch Entzündung und progressive Zerstörung des Synovialgewebes und der Knorpelmatrix gekennzeichnet. Bei Patienten mit beiden Erkrankungen

zeigte Synovektomie-Gewebe erhöhte Expressionsraten von Cathepsin L, D und B, daraus wurde auf eine Beteiligung der Proteasen am Krankheitsverlauf geschlossen (Taubert et al. 2002).

Auch bei Erkrankungen der arteriellen Gefäßwand, wie Atherosklerose und abdominales Aortenaneurysma, ist Cathepsin L an den extensiven vaskulären Umbauvorgängen mit Elastolyse und Kollagenolyse beteiligt. In den lädierten glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Makrophagen fand man eine erhöhte Expression von Cathepsin L, die scheinbar durch proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren induziert wurde. Die starke Korrelation zwischen dem Ausmaß einer Stenose des Ramus interventricularis anterior und dem Serum-Cathepsin L-Spiegel dieser Patienten erhärten den Verdacht einer Beteiligung des Enzyms an dieser Erkrankung (Liu et al. 2005).

Cathepsin L baut Serum-, Zytoplasma- und Kernproteine aber auch viele extrazelluläre Proteine, wie z.B. Laminin, Fibronectin, diverse Kollagene, Elastane und andere Basalmembranbestandteile ab. Letzteres scheint die lokale Tumorausbreitung, die Tumorzellinvasion und die Metastasierung zu fördern. Verschiedene Tumorzelllinien überexprimieren Cathepsin L oder seine mRNA, so z.B. Tumorzellen nichtkleinzelliger Bronchialkarzinome (Kraft 2004), Pankreaskarzinome (Niedergethmann et al. 2004), Prostatatumoren (Colella et al. 2004), kolorektale Karzinome (Troy et al. 2004) und Basalzellkarzinome (Frohlich et al. 2004). Cathepsin L wird als Proenzym sezerniert, das in Anwesenheit von extrazellulären Glykosaminoglykanen leicht zum reifen Enzym prozessiert wird (Ishido und Kominami 1995). Für einige dieser Tumorarten könnte die erhöhte Cathepsin L-Expression als negativ prognostischer Marker genutzt werden. Bei Pankreasadenokarzinomen wurde eine signifikante Korrelation der Expressionsraten von Cathepsin L und B mit den Parametern TNM-Klassifizierung, Lymphknotenstatus, Tumorgröße und Überleben nach kurativer Resektion bereits bewiesen (Niedergethmann et al. 2004). Inhibitoren von Cathepsin L könnten die Tumorausbreitung bremsen und eine Metastasierung verhindern. Im Matrigel konnte ein solcher Inhibitor die Invasivität von maligne transformierten Zellen aufheben (Ravanko et al. 2004). *In-vivo* Versuche mit Cathepsin L-antisense-RNA führten zu einem ähnlichen Ergebnis (Kirschke et al. 2000).

Die dreidimensionale Struktur des humanen Procathepsin L wurde 1996 mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt (Coulombe et al. 1996). Wie Abbildung 1 zeigt, ist das Molekül globulär und besteht aus dem N-terminalen Prosegment (rot) und der katalytischen Einheit, dem sogenannten reifen Enzym (hellblau).



**Abbildung 1: Dreidimensionale Struktur des humanen Procathepsin L.** Die auf Röntgenkristallstrukturdaten basierende Darstellung wurde der Brookhaven Datenbank (BDB-Code: 1CJL) entnommen. Am N-Terminus erkennt man die 100 Aminosäuren lange Proregion (rot), deren 3 Helices spezifiziert sind. Das reife Enzym (hellblau) besteht aus zwei etwa gleich großen Domänen und der dazwischen liegenden Substratbindungsstelle, auf die der schwarze Pfeil verweist. Beschriftet ist außerdem Alanin 1, die Übergangsstelle von der Proregion zum reifen Enzym.

Letzteres besteht aus zwei Domänen, die das aktive Zentrum mit den katalytischen Resten Cystein 25 und Histidin 163 begrenzen. Cystein 25 befindet sich in der ersten, überwiegend  $\alpha$ -helicalen Domäne, während Histidin 163 in der zweiten überwiegend  $\beta$ -gefalteten Domäne liegt. Das Prosegment hat zwei strukturell verschiedene Abschnitte: N-terminal eine globuläre Domäne, die etwa die ersten 75 Aminosäurereste umfasst und aus drei  $\alpha$ -Helices besteht, deren hydrophobe und aromatische Seitenketten am Berührungspunkt einen hydrophoben Kern bilden. Eine kurze Schleife verläuft von der ersten  $\alpha_1$ -Helix zur zentralen, langen, amphipathischen  $\alpha_2$ -Helix. Diese zwei Helices stehen im typischen Winkel von  $-65^\circ$  zueinander. An einen gestreckten Abschnitt, der entlang der  $\alpha_2$ -Helix eine Haarnadelstruktur bildet, schließt sich eine dritte Helix an, die in den C-terminalen Anteil des Prosegments übergeht. Dieser nimmt hingegen eine gestreckte Konformation an und verläuft durch die Substratbindungsstelle zum N-Terminus des reifen Enzyms.

Liegt die Proregion nicht wie eben dargestellt kovalent an das reife Enzym gebunden sondern im freien Zustand vor, so spricht man vom Propeptid. Da Propeptide ihre Mutterenzyme hochaffin in Ein-Schritt-Reaktionen hemmen, kann angenommen werden, dass sie

auch in freier Form ähnlich wie im Zymogen strukturiert sind. Dafür gibt es auch noch weitere indirekte Hinweise, z. B. aus Messungen des Circular Dichroismus und der endogenen Tryptophanfluoreszenz (Fox et al. 1992, Li et al. 1995, Maubach et al. 1997, Billington et al. 2000, Pietschmann et al. 2002). Ein eindeutiger Beweis müsste allerdings noch durch NMR oder Röntgenstrukturanalyse erfolgen, daran wurde gearbeitet (Kaulmann 2004).

Zumindest bei einigen Mitgliedern der Papainfamilie erfüllt die Proregion eine weitere Funktion, sie wirkt als intramolekulare Faltungshilfe und ermöglicht die Ausbildung der nativen Struktur des Mutterenzyms. Bewiesen wurde diese sogenannte Foldase-Funktion der Proregion durch *in vitro trans*-Experimente bisher für Cathepsin L, S und K (Yamamoto et al. 1999, Pietschmann 2002, Sehmisch 2005). Bei den Untersuchungen zur Propeptid-/Proregion-katalysierten Faltung unterscheidet man generell die sogenannten *trans*-Experimente, bei denen das freie Propeptid zur Renaturierung des Mutterenzyms eingesetzt wird, von den *cis*-Ansätzen, in denen die Proregion noch kovalent über eine Peptidbindung mit dem zu renaturierenden Mutterenzym verbunden ist. In *trans*-Versuchen mit Cathepsin S hat die Zugabe des Propeptids zu denaturiertem Enzym zu einer erheblichen Steigerung der Renaturierungsgeschwindigkeit des Enzyms im Vergleich zur Spontanrenaturierung geführt. Beim Zusatz von Mutanten des Propeptides, die spontan keine Tertiärstruktur mehr ausbilden konnten, blieb dieser Effekt aus (Pietschmann 2002). In Über-Kreuz-Versuchen wurde die Spezifität der Foldasewirkung der Propeptide der Cathepsine K und S gegenüber ihren Mutterenzymen untersucht. Die Ausbeute bei Renaturierung der Cathepsine K und S mit dem Propeptid des jeweils anderen Enzyms führte zu allenfalls minimalen Ausbeuten (Sehmisch 2005). Foldasen sind also hochspezifische Faltungskatalysatoren, die thermodynamisch ungünstige, d.h. Geschwindigkeits-limitierte Schritte im Verlauf der Proteinfaltung beschleunigen. Die Struktur der Proregion dient dabei als Matrize für die Ausbildung von Abschnitten der Raumstruktur des Enzyms, die sich spontan nicht ausbilden können. Diese Tatsache begründet die Verwendung des aus der Enzymologie entlehnten Begriffs Foldase in der Literatur (Sauter et al. 1998). Ursprünglich wurden die Proregionen auch als „intramolekulare Chaperone“ bezeichnet (Vijayalakshmi et al. 2001), dabei sind sie jedoch spezifische Faltungshilfen ihrer Mutterenzyme, während Chaperone unspezifisch die meist ATP-abhängige Bildung der Struktur neusynthetisierter Polypeptidketten beschleunigen. Die detailliertesten Untersuchungen bezüglich des Mechanismus der Propeptid-katalysierten Proteinfaltung existieren für Subtilisin (Zhu et al. 1989, Inouye 1991) und die  $\alpha$ -lytische Protease (Sohl et al. 1998), zwei bakterielle Serinproteinasen. Beide Enzyme verfügen ebenso wie die Cathepsine über Proregionen, die allerdings sofort nach der korrekten Faltung des

Mutterenzym autokatalytisch abgespalten werden. Fehlen die Proregionen kommt es nur zur Ausbildung einer unvollständigen, instabilen und funktionslosen Tertiärstruktur, den sogenannten Molten globules. Diese Faltungsintermediate können sich dann spontan nur extrem langsam zur kompakten reifen Form umwandeln, die Anwesenheit der intakten Proregion kann diesen Schritt jedoch katalysieren (Eder et al. 1993, Sohl et al. 1998).

Bezüglich der Foldasewirkung der Proregion von Cathepsin L gibt es nicht nur die schon zitierte *trans*-Untersuchung mit dem Enzym aus Seidenraupen (Yamamoto et al. 1999), sondern auch *cis*-Experimente, die das Ziel hatten, die Notwendigkeit der intakten Struktur der Proregion für die korrekte Faltung des Mutterenzym zu untersuchen. Dazu wurden Mutanten mit verkürzter bzw. fehlender Proregion in *E. coli* exprimiert und aus Einschlusskörperchen gewonnen. Ihre Rückfaltung erwies sich jedoch als schwierig beziehungsweise unmöglich, wobei die Rückfaltungseffizienz indirekt proportional zur Deletionsgröße in der Proregion (Smith and Gottesman 1989) war. Ogino et al. (1999) exprimierten das normale Ratten-Procathepsin L sowie zwei Mutanten mit verkürzten Propeptiden in *E. coli* und verglichen die Enzymaktivitäten der Moleküle nach ihrer Rückfaltung. Die Enzyme mit mutierter Proregion zeigten dabei wesentlich geringere Aktivitäten, was auf eine inkorrekte Faltung zurückgeführt wurde (Ogino et al. 1999). In *in-vivo* Versuchen wurde die Proregionsequenz von Maus-Cathepsin L durch die Proregionsequenz der verwandten Protease Aleurain ersetzt. Während normales Cathepsin L nach der Expression in COS-Zellen sezerniert wurde, wurde das veränderte Enzym im Endoplasmatischen Retikulum retiniert, wie dies für fehlgefaltete Proteine typisch ist, und dort innerhalb von 2 - 6 Stunden abgebaut (Tao et al. 1994).

### **Problemstellung:**

Für Experimente zur Untersuchung der Spezifität der Foldasewirkung der Propeptide nahe verwandter Enzyme in der eigenen Arbeitsgruppe wurde natives humanes Cathepsin L in größeren Mengen benötigt. Natives humanes Cathepsin L ist kommerziell nicht erhältlich, allenfalls mit His-Tag oder als Zwei-Ketten-Enzym. Die erfolgreiche Expression von Cathepsin L wurde mehrfach beschrieben, die Ausbeuten waren aber bisher sehr gering. Dieser Nachteil sollte überwunden werden, mein Ziel war die Entwicklung eines effizienten Verfahrens zur präparativen Herstellung von rekombinanten humanen Cathepsin L, das bezüglich seiner physikochemischen und kinetischen Eigenschaften umfassend charakterisiert werden sollte.

## 4. Materialien und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Enzyme, Reagenzien, Antibiotika, Standards, Substanzen, Medien, Puffer

Restriktionsenzyme:	NdeI	(10 U/ $\mu$ l)	Fermentas
	HindIII	(10 U/ $\mu$ l)	Fermentas
	BamHI	(10 U/ $\mu$ l)	Fermentas
	DpnI	(10 U/ $\mu$ l)	Fermentas
T4-DNA Ligase			Fermentas
Taq-DNA-Polymerase		(5 U/ $\mu$ l)	Invitrogen
Pfu-Polymerase		(2,5 U/ $\mu$ l)	Fermentas
primärer Antikörper:	1/36 (monoklonaler Maus-Antikörper)		von E. Weber aus Halle
sekundärer Antikörper:	Anti-mouse-IgG-HRP		Santa Cruz (sc-2375)
Rekombinantes humanes Cathepsin L, His-Tag			Calbiochem
Rekombinantes humanes Cathepsin L-Propeptid (Gelöst in Natriumacetatpuffer 50 mM pH 4,5 / 6 M Guanidinhydrochlorid.)			aus der eigenen Arbeitsgruppe
Cathepsin L-Substrat Z-Phe-Arg-AMC (Verwendet als 10 oder 20 mM Stammlösung in DMSO.)			Bachem
Pepsin aus Schweinemagen (Verwendet als 1 mM Stammlösung in Zitratpuffer 100 mM pH 4,0.)			Serva
Bradford-Reagenzien Roti Quant Lösung			Roth
Cathepsin L-Inhibitor E64 (Verwendet als 700 $\mu$ M Stammlösung in H <sub>2</sub> O.)			Bachem

Antibiotika:	Ampicillin	Roth
	Chloramphenicol	Roth
Isopropylthio- $\beta$ -galaktosid (IPTG)		Roth
Protein-Molekulargewichtsstandards:	Bench Mark Prestained Protein Ladder	Invitrogen
	Bench Mark Protein Ladder	Invitrogen
	SeeBlue Plus2 Prestained Standard	Invitrogen
DNA-Größenstandards:	Gene Ruler 100 bp	Fermentas
	1 kbp DNA Ladder	Invitrogen
PCR-dNTP Mix:	je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Eppendorf
10* PCR-Puffer:	800 mM Tris/HCl, pH 8,9 //	Invitrogen
	200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ //	
	50 mM $\text{MgCl}_2$	
10* T4-DNA-Ligasepuffer:	400 mM TrisHCl // 100 mM $\text{MgCl}_2$	Fermentas
	// 100 mM DTT, 5 mM ATP	
10* Puffer R+		Fermentas
10* Puffer Y+/Tango		Fermentas
ECL-Lösung	Western Lightning Chemi-	Perkin
	luminescence Reagent Plus	Elmer
Blot-Membran	Hybond-C Extra, Nitrocellulose	Amersham
		Biosciences
Milchpulver		Roth
PBS (151,6 mM):	8 g NaCl // 0,2 g KCl // 3,63 g	
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ //	
	0,24 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ // pH 7,2 mit	
	Aqua dest. ad 1 l auffüllen	

LB-Medium: 5 g/l Hefeextrakt // 10 g/l Casitone // 10 g/l NaCl // pH 7,4  
 LB-Platten: 5 g/l Hefeextrakt // 10 g/l Casitone // 10 g/l NaCl // 15 g/l Bacto-Agar  
 Die Medien wurden 20 Minuten bei 120°C autoklaviert.

SOC-Medium: 5 g/l Hefeextrakt // 20 g/l Casitone // 0,5 g/l Natriumchlorid//  
 10 mM Magnesiumchlorid // 20 mM Glukose // pH 7,0  
 50\* TAE: 242 g/l TrisHCl // 18,6 g/l EDTA // Zugabe von Essigsäure bis pH 8,0

Alle anderen hier nicht aufgeführten Reagenzien stammten von verschiedenen Herstellern und hatten mindestens den Reinheitsgrad pro analysi.

#### **4.1.2 Reagenziensätze zur Bearbeitung von DNA**

Gelelution: QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)  
 Sequenzierung: Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences)  
 Plasmidisolierung: NukleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel)  
 Klonierung: TOPO TA Cloning (Invitrogen)

#### **4.1.3 Vektoren und Bakterienstämme**

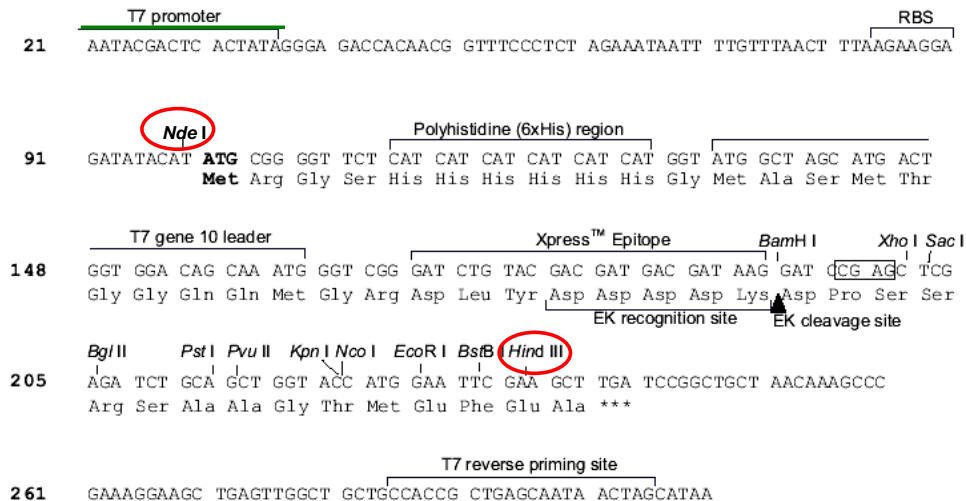
Klonierungsvektor pCR2.1-TOPO (Invitrogen)

Dieser linearisierte Vektor ist Bestandteil des Reagenziensatzes TOPO TA Cloning und verfügt über einen 3'-Desoxythymidinüberhang.

Expressionsvektor pRSET-B (Invitrogen)

Dieser Vektor dient der Proteinexpression in Bakterien unter der Kontrolle des T7-Promotors. Genutzt wurden die Schnittstellen für Hind III und NdeI zur Insertion der cDNA und das Ampicillin- Resistenz- Gen zur Selektion.





**Abbildung 2: Sequenzausschnitt aus dem pRSET-B-Vektor:** Dargestellt sind der für den Vektor charakteristische T7-Promotor (grüner Strich), die strangabwärts gelegene NdeI-Schnittstelle und die HindIII-Schnittstelle (rote Kreise) in der Multiplen Klonierungsstelle.

#### Klonierungsstamm *E.coli* TOP10

(Invitrogen)

Dieser *E. coli*-Stamm wurde zur Klonierung und Blau/Weiß-Selektion ohne IPTG-Einsatz verwendet.

#### Expressionsstamm *E.coli* BL21 (DE3) pLys S

(Invitrogen)

Dieser Expressionsstamm enthält den lysogenen Bakteriophagen  $\lambda$ DE3 und bildet mit dem hier verwendeten pRSET-B-Vektor das „Bakteriophage T7 RNA-Polymerase-Promotor System“. Im genetischen Material des lysogenen Bakteriophagen ist die T7-Polymerase kodiert. Sie bindet an den T7-Promotor des Vektors pRSET-B und führt zur Transkription des Inserts. Der bakterielle lac-Repressor verhindert die Transkription des Inserts und der T7-Polymerase durch Blockade des T7-Promotors bzw. des lacUV5-Promotors. Durch IPTG kann diese Blockade aufgehoben werden. Die Zellen dieses Stammes enthalten das Plasmid pLysS mit der genetischen Information für die Chloramphenicol-Resistenz sowie für das T7-Lysozym. Letzteres bindet die T7-RNA-Polymerase, inaktiviert sie und unterdrückt so die basale Transkription des Inserts.

#### 4.1.4 Geräte

Chromatographie: ÄKTA Purifier 10 mit HiLoad 16/10 Phenylsepharose-HP-Säule (Pharmacia)  
HiTrap HIC-Selection Kit (Pharmacia)

DNA-Sequenzierung: LI-COR 4000L (MWG Biotech)

Elektrophorese: SDS-Elektrophorese-System, Mini-PROTEAN II (Biorad)  
Agarosegelelektrophoresekammern (Werkstatt des Instituts)  
Geldokumentationssystem Image Master VDS (Pharmacia Biotech)  
Elektrophoretische Transferzelle (Trans-Blot Semi Dry) (BioRad)  
Gel Dryer 583 (Bio Rad)  
Voyager System 2012 (PE Biosystems)

Fluorometrie: Mikrotiterplattenfluorometer Spectra Max Gemini (Molecular Devices)  
F-Mikrotiterplatten = schwarz, 96 Well, F-Form (Greiner Bio-One)  
U-Mikrotiterplatten = transparent, 96 Well, U-Form (Greiner Bio-One)  
Luminescence Spectrometer LS 50 B (Perkin Elmer)  
Quarzglas-Küvetten (2 ml Probenvolumen, 1 cm Schichtdicke) (Hellma)

Photometrie: Spektral Photometer DU 70 (Beckman) mit  
Quarzglas-Küvetten Halbmikro und Mikro (0,5 bzw. 0,1 ml Proben-  
volumen, 1 cm Schichtdicke) (Hellma)  
UV 1202 Photometer (Shimadzu)

#### Kultivierung und Fraktionierung von Bakterienzellen:

Brutschrank (Heraeus)  
Schüttel-Inkubator 3032 (GFL)  
Rotary Mixer (Labinco)  
Ultraschall-Desintegrator, Bandelin Sonoplus HD70  
(Bandelin Elektronik)  
Gradientenmischer (Werkstatt des Instituts)

Allgemeine Laborausüstung:

pH-Messung: pH-Meter CG 840 (Schott) mit Mikrogaselektrode SenTix (WTW)

Pipetten Hubkolbenpipetten verstellbar 2,5 bis 2500 µl Reference-Serie (Eppendorf)  
12-Kanalpipetten verstellbar 10, 50 und 300 µl (Eppendorf)

Schüttler Vortex Genie 2 (Scientific Industries)  
Vortexer VF2 (IKA Labortechnik)

Thermogeräte Mikrowellenherd (AEG)  
Refrigerated Bath RB-5A (Techne)  
Thermostat F10 (Julabo)  
Thermostat E1 (Medingen)  
Thermoblock DB 2A (Techne)  
Thermocycler PTC-100 (MJ Research, Inc)

Waage Waage MC1 (Sartorius)

Zentrifugen Centrifuge 5403 (Eppendorf)  
Zentrifuge RC-5B (Sorvall)  
Tischzentrifuge 5417R (Eppendorf)  
Tischzentrifuge MC 12V (Sorvall)  
Ultrazentrifuge L70 mit Rotor SW 28 (Beckmann)

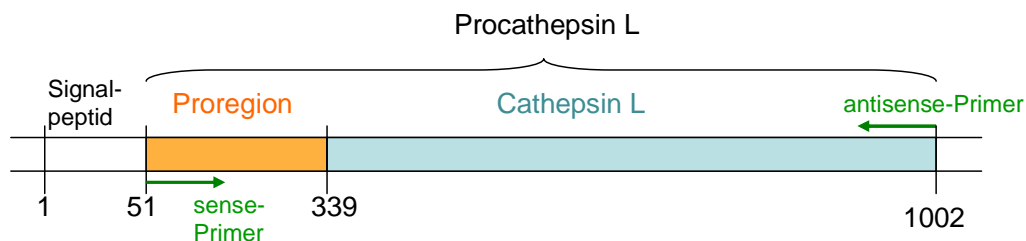
**4.1.5 Computerprogramme**

Word (Microsoft)  
Power Point (Microsoft)  
Excel (Microsoft)  
Prism 4.0 (Graph Pad)  
SigmaPlot 8.0 (SPSS Inc.)  
SPSS 10.0 (SPSS Inc.)  
Cademo (BioMath GmbH)  
Aida Gelscan (Fuji)

## 4.2 Methoden

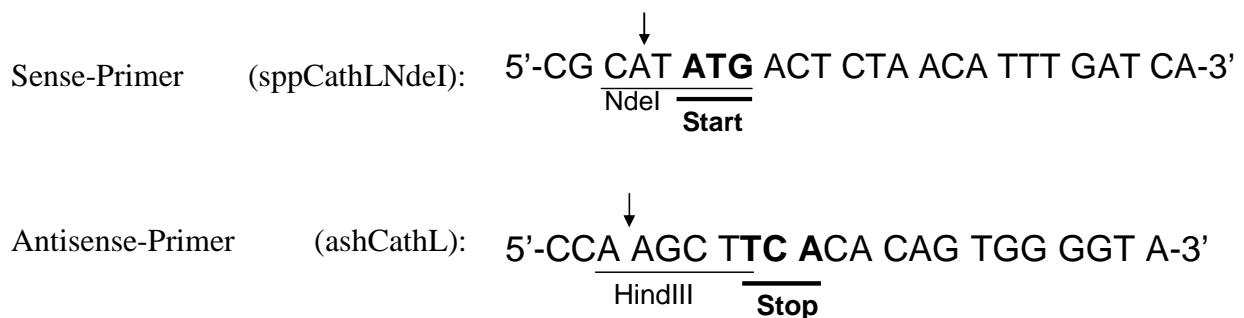
### 4.2.1 Molekularbiologische Methoden

Für die **Amplifikation der genetischen Information von Procathepsin L** durch PCR stand mir das Plasmid pcDNA 3.1 hProcathL (p309), das von Abulizi Abudula im Institut für Biochemie I an der FSU Jena hergestellt wurde und die cDNA des Procathepsin L (Abbildung 3) enthielt, als Matrice zur Verfügung (Abudula 2001).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der DNA-Sequenz des humanen Procathepsin L.** Dargestellt ist das aus 951 Basenpaaren bestehende Procathepsin L mit der orange unterlegten Prosequenz (52.-339. Basenpaar) und dem blau unterlegten reifen Cathepsin L (340.-1002. Basenpaar) sowie seine Signalsequenz (1.-51. Basenpaar). Zusätzlich sind der Sense und der Anti-sense Primer eingezeichnet, die zur PCR-Amplifizierung verwendet wurden.

Die Amplifikation wurde durch PCR mit folgenden Primern durchgeführt.



Unterstrichen sind die Erkennungssequenzen, die Pfeile markieren die Schnittstellen der Restriktionsenzyme. Die Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze und die zugehörigen Programmabläufe sind für alle Arbeitsschritte, die auf dieser Methode basieren, in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1: Zusammenstellung der Ansätze und Programme aller durchgeführten Polymerasekettenreaktionen.**

<b>PCR- Ansatz:</b>	<b>Amplifikation der cDNA des Procathepsin L</b>	<b>Anhängen von Desoxyadenosinresten an die 3'-Enden der cDNA des Procath. L</b>	<b>DNA-Sequenzierung</b>	<b>Rückmutation (Mutagenese)</b>
DNA	1 µl <i>Plasmid pcDNA 3.1 hProcathL (p309)</i>	4,3 µl <i>eluierte DNA (82 ng/µl)</i>	Entsprechend der Herstellerangaben	1 µl <i>Template-DNA (300 ng)</i>
Sense Primer	6 µl <i>sppCathLNdeI (10 µM)</i>	-		8 µl <i>fhmCathL (10 µM)</i>
Antisense Primer	6 µl <i>ashCathL (10 µM)</i>	-		8 µl <i>rhmutCathL (10 µM)</i>
Polymerase	0,75 µl <i>Pfu- Polymerase</i>	0,1 µl <i>Taq- Polymerase</i>		1,5 µl <i>Pfu- Polymerase</i>
PCR- dNTP- Mix	1,5 µl	0,2 µl		1,5 µl
PCR- Puffer	7,5 µl <i>mit 20 mM MgSO<sub>4</sub></i>	1 µl <i>mit 50 mM MgCl<sub>2</sub></i>		7,5 µl
H <sub>2</sub> O	52,25 µl	4,4 µl		55,5 µl
Gesamtvolumen	75 µl	10 µl		75 µl
<b><u>PCR- Programm:</u></b> 1. Denaturierung 95°C	3 min	-	2 min	3 min
2. Primeranlagerung (Annealing)	45 s (44°C)	-	15 s (55°C)	30 s (57°C)
3. Kettenwachstum (Elongation) 72°C	2 min 30 s	10 min	20 s	A: 6 min 30 s B: 5 min
4. Denaturierung 95°C	20 s	-	15 s	30 s
5. Wiederholung der Schritte 2-4	30mal	-	25mal	25mal (5* Elongation A, 20* B)
6. Primeranlagerung (Annealing)	45 s	-	15 s	30 s
7. Kettenverlängerung (finale Extension) 72°C	10 min	-	-	10 min
8. Abkühlung 4°C				

Für die **Agarose-Gelelektrophoresen** zur Auftrennung und Isolation von DNA wurden 1%ige Agarosegele verwendet. 0,5 g Agarose wurden durch Erwärmung in 50 ml 1\* TAE-Puffer gelöst. Nach der Zugabe von 25 µg Ethidiumbromid wurde das flüssige Gel zum Erstarren in mit Kämmen bestückte Kammern gegossen. Die Elektrophorese lief bei einer Spannung von 100 V über etwa 50 Minuten. Ethidiumbromid, lagert sich in die DNA ein und ermöglicht die einfache Detektion der Banden durch eine im ultravioletten Licht gut sichtbare Fluoreszenz. Die DNA-Elution aus Agarosegelen erfolgte genau nach Anleitung zum verwendeten Reagenziensatzes (QIAquick Gel Extraction Kit). Die Bestimmung der DNA-Konzentration im Eluat erfolgt nach 1:20 Verdünnung photometrisch ( $OD_{260} = 1.0$  entspricht einer DNA-Konzentration = 50 µg/ml).

Die **Ligation** der PCR-Produkte mit Desoxyadenosinüberhang mit dem Klonierungsvektor pCR 2.1 TOPO sowie die **Transformation** der Bakterienzellen des Klonierungsstammes E.coli TOP 10 mit diesem Konstrukt erfolgten wie im Handbuch des dazu verwendeten Reagenziensatzes (TOPO TA Cloning) beschrieben. Nach der Transformation wurde die Bakteriensuspension auf LB-Agar-Platten, die Ampicillin (100 µg/ml) für das selektive Wachstum und X-Gal (40 µg/ml) für die Blau-Weiß-Selektion enthielten, ausgestrichen und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Bei der **Blau-Weiß-Selektion** macht man sich das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase zu Nutze, das die glykosidische Bindung des künstlichen Galaktosederivats 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid (X- Gal) hydrolysiert. Das Produkt oxidiert an der Luft spontan zu einem blauen Indigo-Farbstoff. Das Enzym wird von der Bakterienzelle ohne das zur vollständigen Funktion notwendige  $\alpha$ -Fragment exprimiert, dessen Gen sich jedoch auf dem eingebrachten Plasmid befindet. In transformierten Zellen können sich die Fragmente zum funktionsfähigen Enzym verbinden ( $\alpha$ -Komplementierung) und das Substrat umsetzen. Die Kulturen färben sich also blau. Enthält das Plasmid allerdings ein Fremd-DNA-Fragment, kommt es zu einer Rasterverschiebung und die Sequenz für das  $\alpha$ -Fragment kann nicht mehr korrekt abgelesen werden. Zellen, die ein solches rekombinantes Plasmid aufgenommen haben, synthetisieren keine funktionsfähige  $\beta$ -Galaktosidase und bleiben daher auch in Gegenwart des Indikatorsubstrates farblos, die entsprechenden Kulturen erscheinen weiß. Sie wurden als positiv bezeichnet, in 5 ml LB-Medium, dem 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt war, überführt und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln vermehrt. Die nachfolgende Minipräparation zur **Plasmidisolierung** erfolgte exakt nach der Vorschrift des Reagenziensatzes NucleoSpin®Plasmid.

Die Spaltung von DNA (PCR-Produkte und Vektoren) mit **Restriktions-**endonukleasen erfolgte durch 1-2stündige Inkubation bei 37°C in den folgenden Ansätzen (Tabelle 2):

**Tabelle 2: Zusammenstellung aller Restriktionsbedingungen.**

<b><u>Restriktions- ansatz:</u></b>	<b>Restriktion der cDNA des Procathepsin L aus dem Vektor pCR 2.1 TOPO</b>	<b>Restriktion der cDNA des Procathepsin L aus dem Vektor pRSET-B</b>	<b>Restriktion religierter Vektoren (pRSET-B)</b>
DNA	3 µl <i>pCR 2.1 TOPO</i> (0,5 – 1 µg)	18 µl <i>pRSET-B</i> (280 ng/µl)	30 µl <i>Ansatz nach Ligation der cDNA von Procathepsin L mit pRSET-B</i>
1. Restriktions- enzym	0,3 µl <i>NdeI</i>	2 µl <i>NdeI</i>	0,3 µl <i>BamHI</i>
2. Restriktions- enzym	0,3 µl <i>HindIII</i>	2 µl <i>HindIII</i>	-
Puffer	1 µl <i>10* Puffer R+</i>	6 µl <i>10* Puffer R+</i>	1,2 µl <i>Kaliumazetat</i> (5 M, pH 7,8)
H <sub>2</sub> O	5,4 µl	32 µl	28,5 µl
Gesamtvolumen	10 µl	60 µl	60 µl
<b><u>Restriktions- bedingungen:</u></b>			
Inkubationsdauer bei 37°C	1 – 2 h	2 h	1 h

Die angegebenen Volumina gelten für den analytischen Verdau, bei präparativen Ansätzen wurden die Volumina proportional erhöht. Wenn nur ein Restriktionsenzym zugegeben wurde, ist das fehlende Volumen durch Wasser ersetzt worden.

Für die DNA- **Sequenzierung** wurde die Didesoxymethode nach Sanger genutzt. Als Reagenziensatz diente dabei der Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit. Die Primer wurden so konstruiert, dass sie außerhalb der zu analysierenden Sequenz an das Plasmid binden:

IR8 sense                      5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'

IR9 anti-sense                5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'

Da die zu untersuchende Sequenz länger als der zuverlässige Lesebereich des verwendeten LI-COR 4000 L Sequenzer (Software “Base ImagIR“) ist, mussten die Ergebnisse zweier Durchgänge mit je einem der beiden Primer kombiniert werden. Der Sequenzierungsansatz wurde nach den Angaben des Herstellers pipettiert und dem in Tabelle 1 aufgeführten PCR-Programm unterzogen.

Zur **Ligation** wurde die DNA-Sequenz für Procathepsin L mit dem Expressionsvektor pRSET-B im Verhältnis 3:1 in folgendem Ansatz eine Stunde bei 22°C inkubiert. Die Ligase musste anschließend 10 Minuten bei 65°C inaktiviert werden.

**Tabelle 3: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Ligation der cDNA von Procathepsin L mit dem Vektor pRSET-B**

2 µl	pRSET-B (120 ng/µl) (nach NdeI / HindIII- Restriktion)
17 µl	ProCathL–Gensequenz (13,8 ng/µl) (geleluert, nach NdeI / Hind III-Restriktion)
3 µl	T4-DNA-Ligasepuffer
1 µl	T4-DNA-Ligase
7 µl	H <sub>2</sub> O
30 µl	Gesamtvolumen

Zum **Zerschneiden** der vor Einbau des Inserts **religierten Vektoren** wurde das Restriktionsenzym BamHI verwendet. Es schneidet in dem Bereich des Vektors, der bei regelrechter Restriktion von NdeI und HindIII ausgeschnitten und durch das Insert ersetzt wird. Vektoren, die kein Insert tragen, wurden nach dem in Tabelle 2 gelisteten Protokoll durch BamHI linearisiert und sind dadurch nicht mehr transformationsfähig.

Zur **Herstellung kompetenter Zellen** wurden 100 ml LB-Medium mit 200 µl einer Übernachtskultur der Bakterienzellen E.coli BL21 (DE3) pLysS bzw. E.coli TOP10 beimpft. Bei der Kultivierung des Stammes E.coli BL21 (DE3) pLysS wurden 35 µg/ml Chloramphenicol zugesetzt, beim Stamm E.coli TOP10 war das nicht erforderlich. Die Ansätze wurden bei 37°C im Schüttelinkubator (200 rpm) gehalten bis eine OD<sub>600</sub> zwischen 0,4 und 0,6 erreicht war und anschließend 10 Minuten lang bei 4°C und 4000g in vorgekühlten Zentrifugenbechern zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 50 ml Calziumpuffer (50 mM Calziumchlorid, 10 mM Kaliumazetat pH 6,2) resuspendiert und danach 60 Minuten auf Eis belassen.



Die Zentrifugation wurde wiederholt, das Zellpellet wurde diesmal aber in nur 5 ml Konservierungspuffer (Calciumpuffer + 20% Glycerol) resuspendiert, portioniert in vorgekühlte Eppendorfgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Zur **Transformation** mit dem Konstrukt aus Vektor pRSET-B und Insert wurden 100 µl kompetente Bakterienzellen vorsichtig im Eisbad aufgetaut und 100 - 300 µg Plasmid-DNA (2 µl) zugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis erfolgte ein 45 Sekunden langer Hitzeschock bei 42°C, dann die Abkühlung im Eis. Dann wurden 500 µl SOC-Medium zugegeben, 1 Stunde unter Schütteln bei 37°C inkubiert und anschließend wurden Aliquots auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Um selektives Wachstum der transformierten Bakterienzellen zu ermöglichen, war dem Agar 50 µg/ml Ampicillin und 35 µg/ml Chloramphenicol für den Stamm E.coli BL21(DE3) pLysS bzw. 100 µg/ml Ampicillin für E.coli TOP10 zugesetzt worden.

Die gleichen Antibiotikazusätze erfolgten zu der Flüssigkultur bei der **Proteinexpression im analytischen oder präparativen Maßstab**. In beiden Fällen wurden 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie oder mit einem Tropfen aus einer Glycerolkonserve beimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Aus solchen Übernachtskulturen wurde bei Bedarf das Material für neue Glycerolkonserven entnommen, 1:1 mit 80% Glycerol verdünnt und bei -80°C gelagert. Für die Hauptkulturen wurden Aliquots der Übernachtskultur zu Antibiotika-haltigem LB-Medium gegeben, analytisch 2 ml zu 30 ml, präparativ 4 ml zu 200 ml. Nach etwa 4 stündiger Inkubation hatten die Hauptkulturen eine optische Dichte OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,6 erreicht und die Expression konnte durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert werden. Präparativ wurde meist mit 12 Kolben, also 2,4 Liter Kulturansatz gearbeitet. Die Zellen wurden 3 Stunden nach der Induktion abzentrifugiert (Sorvall, Rotor GS-3, 10 Minuten, 4°C, 4000 g), die Pellets in je 4 ml Resuspendierungspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0 // 1 mM EDTA) gelöst und bei Bedarf bei -20°C in Greiner-Röhrchen wenige Tage aufbewahrt. Der Zellaufschluss geschah mittels Ultraschall (Bandelin Sonoplus HD70, dreimal 2 Minuten lang, 60% Intensität, Intervall von 0,8) im Eisbad. Um die DNA zu fragmentieren und damit die Viskosität der Proben zu vermindern, folgte eine 30minütige Inkubation mit je einer Spatelspitze DNase im Überkopfschüttler (Rotary Mixer) bei Raumtemperatur. Die anschließende Zentrifugation (Sorvall, Rotor SS-34, 10 Minuten, 4°C, 6000 g) trennte lösliche von unlöslichen Zellbestandteilen.

Die Sedimente, in dem sich die Procathepsin L-haltigen Einschlusskörperchen befanden, wurden in jeweils 3 ml Wasch-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0 // 1 mM EDTA // 1 % Triton X-100) resuspendiert und 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Das Detergenz Triton diente zur Entfernung von Membranproteinen (Lilie et al., 1998). Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (Sorvall, Rotor SS-34, 10 Minuten, 4°C, 6000 g) mit Resuspension der Sedimente in je 2 ml Saccharosepuffer (250 mM Saccharose // 10 mM Tris/HCl pH 8,0 // 1 mM EDTA).

Zur **Reinigung** der Einschlusskörperchen wurde die Ultrazentrifugation (Ultrazentrifuge L-70, Rotor SW 28, 2 Stunden, 4°C, 28000 rpm) in kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten genutzt (Coligan et al. 2003). Jeder der durchsichtigen Einmalzentrifugenbecher enthielt 36 ml Gradientenlösung (40 – 70% w/w Saccharose in 10 mM TRIS / HCl, 1 mM EDTA pH 8,0) und wurde mit den 2 ml der oben genannten Suspension überschichtet. Am Ende der Zentrifugation bildeten die Einschlusskörperchen in der unteren Hälfte der Becher eine milchig-weiße Bande, die durch vorsichtiges Anstechen des Röhrchenbodens tropfenweise in 2 ml Fraktionen gesammelt wurde. Durch Trübungsmessung bei 600 nm wurde die Konzentration an Einschlusskörperchen in den Fraktionen abgeschätzt und jeweils die Fraktionen mit dem höchsten Gehalt vereinigt. Um die Saccharose aus den Proben zu entfernen, wurden sie mit je 40 ml Verdünnungspuffer (1 mM Tris/HCl pH 8,0 // 1 mM EDTA) versetzt, geschüttelt und zentrifugiert (Sorvall, 30 Minuten, 4°C, 20000 rpm). Das Gewicht der Pellets wurde bestimmt, pro 100 mg Pellet wurde mit 1 ml Denaturierungspuffer (50 mM Natriumazetat pH 4,5 // 6 M GdnHCl) resuspendiert und über Nacht bei 4 °C, gelegentlich mit einstündiger Ultraschallbad-Behandlung, solubilisiert. Bei Präparationen, in denen auf den Saccharosegradienten verzichtet wurde, wurden die im Triton-haltigen Waschpuffer abzentrifugierten Pellets nach Abgießen des Überstands direkt auf die eben beschriebene Art in Denaturierungspuffer überführt. Das Material konnte in beiden Fällen einige Wochen bei -80°C gelagert werden.

#### 4.2.2 Proteinchemische Methoden

##### **SDS – Polyacrylamid – Gelelektrophorese (SDS- PAGE):**

Zur Probenvorbereitung nach analytischer Expression wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation (1 Minute bei 208000 g) vom Medium abgetrennt. Das Zellsediment wurde in 100 µl PBS resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes Auftauen bei 42°C. Eine zweite Zentrifugation (10

Minuten bei 4°C und maximaler Drehzahl) trennte die löslichen Zellbestandteile von den unlöslichen. Das Sediment wurde mit 1\* Probenpuffer versetzt, zum Überstand wurde soviel 6\* Probenpuffer zugegeben, dass dieser am Ende einfach konzentriert war.

Am Ende der präparativen Expressionen waren die zur Elektrophorese vorgesehenen Proben in Guanidinhydrochlorid gelöst, das mit SDS Präzipitate bildet und deshalb durch **Ethanol-fällung** entfernt wurde. Dazu wurden je 20 µl 1:10 mit eiskaltem 100%igem Ethanol verdünnt und 5 – 10 Minuten bei – 80°C inkubiert. Nach Zentrifugation in der Tischzentrifuge 5417R (5 min, 4°C, 14000 rpm) wurde das Pellet mit 250µl 90%igem Ethanol gewaschen, dann folgte eine erneute Zentrifugation. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das Pellet in 20 µl 1\* Probenpuffer aufgenommen (Coligan et al. 2003).

Durch 10minütige Inkubation bei 95°C wurden die vorbereiteten Proben, auch um eine bessere Lösung im Probenpuffer zu realisieren, denaturiert, anschließend wurden sie auf Eis abgekühlt und bis zum Auftrag auf das Gel bei -20°C aufbewahrt. Eine kurze Zentrifugation bei maximaler Drehzahl trennte unmittelbar vor dem Auftrag ungelöste Proteinaggregate ab, die zu störenden Streifen führen könnten.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen in SDS-Gelen (Lämmli et al. 1970), wobei 5%ige Sammelgele kombiniert mit 10%igen oder 12,5%igen Trenngelen verwendet wurden.

Sammelgel 5 %:      1,5 ml 0,5 M TRIS / HCl pH 6,8 mit 0,4 % SDS // 0,75 ml 40%  
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) // 3,75 ml dH<sub>2</sub>O // 25 µl 10% APS //  
12,5 µl TEMED

Trenngele:            2,25 ml 1,5 M TRIS / HCl pH 8,8 mit 0,4 % SDS // 40 µl 10% APS //  
20 µl TEMED

10 %:                + 2,25 ml 40% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) // 4,5 ml dH<sub>2</sub>O

12,5 %:             + 2,8 ml 40% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) // 3,95 ml dH<sub>2</sub>O

6\* Probenpuffer:    1,5 ml 1 M TRIS / HCl pH 6,8 // 2,5 ml SDS (20 %) // 1 ml Glycerol //  
0,55 ml β-Mercaptoethanol // 6mg Bromphenolblau  
Die Herstellung des 1\* Probenpuffers erfolgte durch Zugabe von 20 ml  
Aqua bidest.

Elektrophoresepuffer: 33 mM TRIS // 190 mM Glycin // 0,1% SDS

Zur Molekulargewichtsabschätzung wurden kommerziell erhältliche Mischungen von Eichproteinen mitgeführt. Die Elektrophoresedauer betrug etwa 45 Minuten bei 200 V.

Zum unspezifischen Proteinnachweis diente die **Coomassiefärbung**. Die Gele wurden 30 - 60 Minuten in der Färbelösung, anschließend in der Entfärberlösung, die mehrmals gewechselt wurde, geschwenkt. Nach Spülung mit H<sub>2</sub>O wurden die Gele mit Gelrockenpuffer befeuchtet und anschließend 15 Minuten lang unter Vakuum bei 60°C zwischen Zellophan getrocknet (Gel Dryer).

Färbelösung:	0,75 g Coomassie-Blau G250 // 200 ml Methanol // 250 ml dH <sub>2</sub> O // 50 ml Essigsäure
Entfärber:	5% Essigsäure // 10% Ethanol
Gelrockenpuffer:	5% Glycerol // 10% Ethanol

Der spezifische Nachweis von Procathepsin L erfolgte durch **Western-Blotting**. Die Übertragung der Proteine vom SDS-Gel auf die Blot-Membran erfolgte elektrophoretisch bei 20 V und 500 mA über 40 Minuten unter Verwendung von Blotpuffer (25 mM TRIS // 192 mM Glycin // 20 % Methanol). Die Membran wurde anschließend 2\* 5 Minuten in TRIS gepufferter Salzlösung (0,1% Tween 20; 1\* TBS: 20 mM Tris/HCl pH 7,6 // 137 mM NaCl) gewaschen, 1 Stunde bei Raumtemperatur in Milchpulverlösung (1\* TBS / 0,1% Tween 20 / 5% Milchpulver) geschüttelt um freie Bindungsstellen der Membran abzusättigen und dann erneut gewaschen. Anschließend erfolgte der spezifische Proteinnachweis durch Inkubation bei 4°C über Nacht mit dem 1:1000 in 1\* TBS, 0,1% Tween 20, 1% Milchpulver verdünnten, monoklonalen IgG- Antikörper 1/36 gegen Cathepsin L. Die Membran wurde erneut 2\* 10 Minuten gewaschen, dann 1 Stunde mit dem 1:12500 in 1\* TBS verdünnten sekundären Antikörper (Anti-mouse-IgG-HRP) inkubiert und wie zuvor gewaschen. Schließlich wurde der Peroxidase-gekoppelte Anti-IgG-Antikörper nach der **Enhanced ChemiLuminescence (ECL)**-Methode mit Luminol als Substrat nach den Angaben des Herstellers nachgewiesen. Zur Detektion dieses Lumineszenzlichts wurde die Membran leicht abgetrocknet in Seranfolie eingewickelt und auf einem Filmstück fixiert. Nach einminütiger Exposition wurde der Film entwickelt, der Film war dort geschwärzt, wo sich auf dem Polyacrylamidgel die Bande des immunreaktiven Proteins befand.

## Methoden zur Proteinbestimmung

Die **densitometrische Auswertung** digitaler Fotos von Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gelen diente zur Quantifizierung einzelner Proteine in Gemischen. Dazu wurde das zu untersuchende Gemisch in mindestens zwei unterschiedlichen Verdünnungen zusammen mit vier Eichlösungen, die bekannte Mengen an Albumin und Chymotrypsinogen enthielten, elektrophoretisch aufgetrennt und die Bilder digitalisiert. Mit dem Computerprogramm Aida Image Analyzer 3.11 wurden die zu quantifizierenden Banden am Bildschirm jeweils durch einen Rahmen markiert. Ein zweiter Rahmen, mit 1 mm Abstand zum ersten, definierte den Saumbereich, der zur Berechnung des Hintergrunds diente. Die vom Programm errechneten Differenzen aus den Intensitäten der Proteinbanden und des Hintergrunds wurden zur Ermittlung einer linearen Eichfunktion und, davon ausgehend, zur Abschätzung der gesuchten Proteinmenge verwendet.

Der **Bradford-Assay** beruht auf der spezifischen Anfärbung von Proteinen durch den Farbstoff Coomassie Brilliantblau G 250. Bei der Bindung des Farbstoffes an kationische und exponierte hydrophobe Seitenketten von Proteinen kommt es im sauren Milieu zu einer Verschiebung des Absorbanzmaximums von 465 nm zu 595 nm, da die anionische Sulfonat-form im Proteinkomplex stabilisiert wird. Die Absorbanz bei 595 nm ist der Proteinkonzentration proportional. Vorteile der Proteinbestimmung nach Bradford sind die einfache und schnelle Durchführung sowie die Unempfindlichkeit gegenüber störenden Ionen und Reduktionsmitteln, z.B. DTT. Die Proteinproben wurden nach der Vorschrift des Herstellers mit der Roti-Quant-Lösung vermischt und nach einer 5 minütigen Inkubation in 1 ml-Küvetten im Photometer DU70 vermessen. Auf diese Weise konnte eine Eichgerade mit Albumin erstellt und zur Errechnung der unbekannten Proteinmengen verwendet werden.

### 4.2.3 Enzymanalytik

Die Bestimmung der **Enzymaktivität** von Cathepsin L erfolgte grundsätzlich durch kinetische Messungen unter Verwendung des Substrates Z-Phe-Arg-AMC, welches in DMSO gelöst war und als 10 bis 20 mM Stammlösung verwendet wurde. Die Zusammensetzung des Testmediums war wie folgt: 50 mM  $K_2HPO_4$  /  $KH_2PO_4$  // pH 6,0 // 50 mM NaCl // 2 mM EDTA // 0,01% Triton X-100 // 2 mM DTT // 1 % DMSO und 20  $\mu$ M Z-Phe-Arg-AMC. Die

Fluoreszenz des freigesetzten Produktes Aminomethylcoumarin wurde bei 360 nm angeregt und bei 440 nm gemessen.

Für umfangreiche analytische Untersuchungen ist die Verwendung von Mikrotiterplatten außerordentlich zeitsparend. Ich arbeitete mit schwarzen Flachbodenmikrotiterplatten, die 96 Proben mit einem Volumen von jeweils maximal 350 µl fassen. Zur Messung wurden die Enzym-haltigen Proben im Verhältnis 1:8 mit dem Testmedium vermischt und die Fluoreszenz im kürzestmöglichen Abstand 10 Minuten lang mit dem Mikrotiterplattenfluorometer Spectra Max Gemini bei Raumtemperatur bestimmt. Dieses Vorgehen wird auch als Mikrotest bezeichnet.

Zur exakten Bestimmung der Enzymaktivität in internationalen Einheiten mussten die fluorometrischen Messungen bei einer definierten Temperatur durchgeführt werden. Dazu führte ich Makrotests in gerührten Küvetten bei 37°C am LS 50B-Fluorometer durch. Das Testmedium wurde im Wasserbad vortemperierte und danach in die im temperierten Küvettenhalter des Gerätes befindliche Küvette gegeben. Der Start der Messung erfolgte zeitgleich mit der Zugabe des Enzyms (maximal 1% des Gesamtvolumens). Im Sekundenabstand wurden 5 Minuten lang die Fluoreszenzintensitäten registriert.

Da der Anstieg der Fluoreszenz der Produktbildung und damit der Enzymaktivität proportional ist, wurde die Produktbildungsrate meist nur als Fluoreszenzänderung pro Sekunde angegeben und mittels linearer Regressionsanalyse nach Gleichung 1 berechnet.

$$P = v_s * t + P_0$$

*Gleichung 1*

(P = Produktkonzentration, P<sub>0</sub> = Produktkonzentration zum Startzeitpunkt; t = Zeit,  
v<sub>s</sub> = stationäre Geschwindigkeit der Reaktion bei der gegebenen Substratkonzentration)

Nur wenn die Enzymaktivitäten so hoch waren, dass es während des Messzeitraums zu einer signifikanten Abnahme der Substratkonzentration kam, musste die Anfangsgeschwindigkeit durch nichtlineare Regression nach Gleichung 2 bestimmt werden.

$$P = (v_z * t) * e^{(-b*t)} + P_0$$

*Gleichung 2*

(v<sub>z</sub> = Geschwindigkeit der Reaktion bei der anfänglichen Substratkonzentration, b = Geschwindigkeitsverlust der Reaktion pro Zeiteinheit durch Substratverbrauch)

Die Eichung des LS 50B-Fluorometer durch AMC-haltigen, substratfreien Testpuffer durch Mehrfachmessungen unter exakt den gleichen experimentellen Bedingungen ermöglichte es, die Produktkonzentrationen aus Fluoreszenzeinheiten in Molaritäten umzurechnen, die bei Kenntnis von  $K_M$  und  $K_{cat}$  nach den Gleichungen 3 und 4 eine Berechnung der Enzymkonzentration (E) ermöglichten.

$$V_{max} = E * k_{cat} \qquad \text{Gleichung 3}$$

( $V_{max}$  = Maximalgeschwindigkeit der Produktbildung errechnet unter Verwendung von Gleichung 4 )

Der  **$K_M$ -Wert** wurde aus einer Serie von Enzymaktivitätsmessungen bei 37°C am LS 50B-Fluorometer mit Substratkonzentrationen zwischen 0,5 und 40  $\mu\text{M}$  im Testmedium bei einer DMSO-Konzentration von 1% ermittelt. Es wurden abwechselnd hohe und niedrige Substratkonzentrationen gemessen, um durch eventuelle Veränderungen des Enzyms im Testverlauf hervorgerufenen Fehler zufällig über den gemessenen Konzentrationsbereich zu verteilen. Aus den über einen Zeitraum von 5 Minuten registrierten Produktbildungskurven wurde jeweils die Anfangsgeschwindigkeit  $v_z$  nach Gleichung 2 berechnet und als Funktion der Substratkonzentration ( $S_0$ ) dargestellt. Unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung (4) konnten die Michaelis-Menten-Konstante für das Substrat ( $K_M$ ) und die Maximalgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) mittels nichtlinearer Regression bestimmt werden.

$$v_z = \frac{V_{max} * S_0}{K_M + S_0} \qquad \text{Gleichung 4}$$

### **E64-Titration der aktiven Enzymkonzentration**

Die Bestimmung der Konzentration an enzymatisch aktivem Enzym ist für die korrekte Berechnung kinetischer Daten absolut unverzichtbar. Für Cysteinproteasen, wie das Cathepsin L, ist die E64-Titration die Methode der Wahl (Barrett et al. 1982). Dazu existiert in der eigenen Arbeitsgruppe eine Vorschrift unter Verwendung von Mikrotiterplatten, die im Vergleich zu den publizierten Standardverfahren Zeit- und Material-sparend ist (Rhode et al. 2000, Kleint 2004). E64 ist ein hochaffiner Inhibitor von Cysteinproteasen, der im Verhältnis

1:1 an die SH- Gruppe im katalytischen Zentrum der Enzyme bindet. Daher kann nach Gleichgewichtseinstellung aus der reziproken Abhängigkeit zwischen der E64-Konzentration und der Restaktivität des Enzyms die Enzymkonzentration errechnet werden. Zur Titration wurden Enzym und E64 mit Substrat- und DMSO-freiem Testmedium pH 6,0 so verdünnt, dass der Konzentrationsbereich <350 nM erreicht wurde. In einer U-Mikrotiterplatte wurden in Doppelbestimmungen je 2,5 µl beider Reaktanten, das Enzym in gleicher, E64 in acht unterschiedlichen Konzentrationen, an gegenüberliegenden Wände der Wells pipettiert, durch kurze Zentrifugation vermischt, abgedeckt und 20 bzw. 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 250 µl Testmedium erfolgte die kinetische Messung der Produktbildungsrate. In dem von mir gewählten Konzentrationsbereich war die Dissoziation des Komplexes aus E64 und Cathepsin L ( $K_i = 0,3 \text{ nM}$ ) nicht zu vernachlässigen. Deshalb musste die totale Enzymkonzentration ( $Y_t$ ) durch nichtlineare Regressionsanalyse aus der Restaktivität ( $Y$ ) als Funktion der E64-Konzentration ( $X$ ) unter Verwendung von Gleichung 5 ermittelt werden.  $Y_0/Y_t$  ist ein Proportionalitätsfaktor, der die Angabe der Enzymaktivität in willkürlichen Einheiten zulässt.

$$Y = Y_0 / Y_t \times (SQRT((K_i + X - Y_t) \times (K_i + X - Y_t) / 4 + Y_t \times K_i) - (K_i + X - Y_t) / 2)$$

*Gleichung 5*

### Prozessierung

Aufgrund der hochaffinen Hemmung durch seine Proregion hat renaturiertes Procathepsin L allenfalls eine minimale enzymatische Aktivität. Vor der Aktivitätsmessung muss es daher zum reifen Enzym prozessiert, also seine Proregion entfernt werden.

Die **analytische Prozessierung** erfolgte heterokatalytisch nach 1:10 Verdünnung von Procathepsin L-haltigen Proben mit einem Pepsin-haltigen Prozessierungsmedium (100 mM Zitrat pH 4,0 // 2 mM EDTA // 2 mM DTT // 40 µM Pepsin) durch 30 minütige Inkubation bei 30°C. Diese Prozessierungsbedingungen sind das Ergebnis eigener systematischer Optimierungsexperimente, die im Abschnitt 5.2 näher beschrieben werden.

Um eine Verunreinigung des Präparates durch Fremdproteasen zu vermeiden, erfolgte die **präparative Prozessierung** autokatalytisch. Gereinigtes Procathepsin L wurde im Eisbad mit den für die Stabilisierung des Enzyms notwendigen Zusätzen EDTA (1 mM) und DTT (2



mM) versetzt und der pH durch Zugabe konzentrierter Natriumzitratlösung (pH 3,0) im Eisbad auf 3,5 eingestellt. Mit der Inkubation bei 37°C begann die Autoprocessing, deren optimale Dauer von der Enzymkonzentration abhängig war, die durch E64-Titration erst am Ende dieses Präparationsschrittes ermittelt werden konnte. Deshalb wurde der Prozessierungserfolg durch zeitgleiche Aktivitätsbestimmung im Abstand von 1 bis 5 Minuten kontrolliert. Nachdem ein Aktivitätsplateau erreicht worden war, wurde der Ansatz eingefroren und in definierten Zeitabständen entnommene Aliquots mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen getrennt. Diese Aliquots waren sofort nach der Entnahme mit Probenpuffer versetzt, auf 95°C erhitzt und bis zum Auftrag auf das Gel auf Eis aufbewahrt worden. War die Autoprocessing vollständig, also elektrophoretisch kein Procathepsin L mehr zu erkennen, wurde durch Zugabe von 1,5 M MES (pH 6,9) auf pH 6,0 eingestellt. Andernfalls erfolgte eine nochmalige Inkubation.

### **Renaturierung**

Die Renaturierung erfolgte grundsätzlich durch 1:100-Verdünnen des vollständig denaturierten Proenzym (6 M Guanidinhydrochlorid // 50 mM DTT) in ein Renaturierungsmedium, das am Ende aller Optimierungsversuche folgende Zusammensetzung hatte: 2 mM EDTA // 0,192 M TRIS // 0,4 M MgCl<sub>2</sub> // 8,35 mM GSH // 7,4 mM GSSG // 0,07 % Brij. Sein pH betrug 8,2. Die optimale Temperatur betrug 19°C, die Dauer mindestens 120 Minuten.

Um das Ausmaß der Renaturierung zu ermitteln wurden dem Ansatz nach dem Start im Verlauf von 2 bis maximal 20 Stunden Aliquots entnommen und in Mikrotiterplatten bei -80°C aufbewahrt. Alle Proben wurden gemeinsam prozessiert und gemessen. Die Messwerte wurden als Funktion der Renaturierungszeit graphisch dargestellt. Es ergaben sich grundsätzlich nichtlineare Abhängigkeiten, nach einem exponentiellen Anstieg mit einer bestimmten Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) wurde ein Sättigungswert ( $v_{\max}$ ), der der Ausbeute entspricht, erreicht. Das wird durch Gleichung 6 beschrieben.

$$A = v_{\max} * (1 - e^{-k*t}) \qquad \text{Gleichung 6}$$

(A = gemessene Aktivität,  $v_{\max}$  = Renaturierungsausbeute, k = Geschwindigkeitskonstante der Renaturierung, t = Renaturierungszeit)

Aus  $k$  konnte die Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) der Renaturierung nach Gleichung 7 berechnet werden.

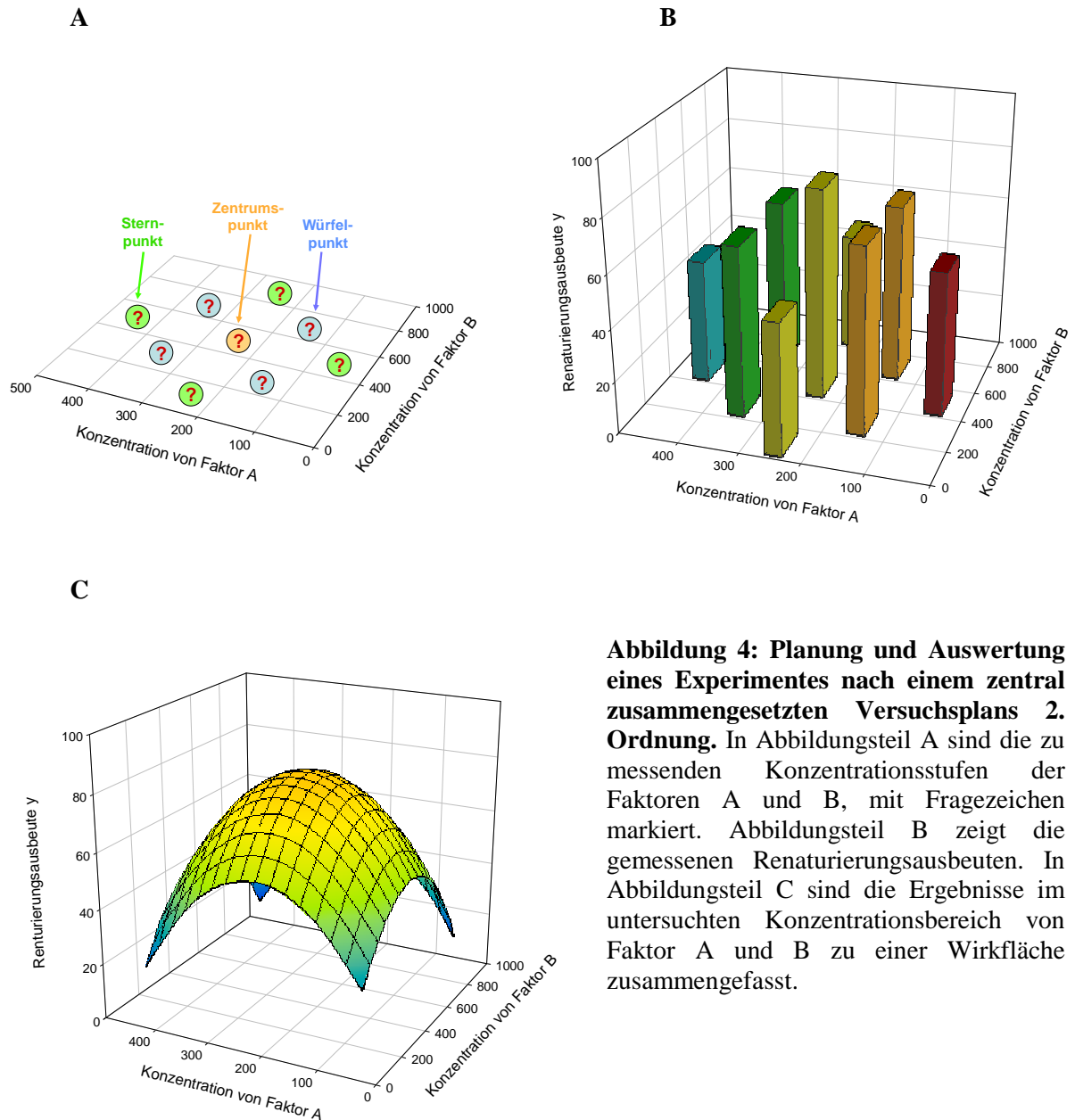
$$t_{1/2} = \ln 2 / k \quad \text{Gleichung 7}$$

Die Vielzahl der zu untersuchenden Einflussfaktoren, deren Wirkung nichtlinear von ihrer Konzentration und oft auch noch von der übrigen Faktoren abhängt, ließ einen hohen Messaufwand erwarten, denn Nichtlinearitäten erfordern zur Beschreibung mindestens drei, besser fünf Messpunkte; Wechselwirkungen sind nur zu entdecken, wenn möglichst viele Konzentrationsstufen der Einflussfaktoren miteinander kombiniert werden. Werden alle Stufen aller Faktoren miteinander kombiniert, spricht man von einem vollständigen Versuchsplan bei dem die Anzahl der Messpunkte = Zahl der Konzentrationsstufen<sup>Zahl der Faktoren</sup> ist. Für die Untersuchung von zwei Faktoren in jeweils fünf Konzentrationen mit allen Wechselwirkungen benötigt man insgesamt  $5^2 = 25$  Messpunkte, bei drei Faktoren wären es dann  $5^3 = 125$ . Dieser Messaufwand ist enorm und es ist nötig einen praktikablen Versuchsplan zu wählen, d.h. die notwendige Anzahl an Messpunkten durfte die methodischen Möglichkeiten im Labor nicht übersteigen. Ich habe in den meisten Fällen **zentral zusammengesetzte faktorielle Versuchspläne 2. Ordnung** gewählt (Rasch et al. 1999). Mit einem solchen Versuchsplan sind für die eben beschriebene Untersuchung zweier Faktoren nur neun Messpunkte notwendig. Abbildung 4 illustriert das Prinzip. Die 25 Felder der xy-Ebene in Abbildungsteil A entsprechen den Messpunkten in einem vollständigen Versuchsplan. Bei einem zentral zusammengesetzten Versuchsplan sind jedoch nur die 9 bunt markierten Felder, die sich symmetrisch um den Zentrumspunkt gruppieren, zu messen. Je höher die Anzahl der Einflussfaktoren ist, umso deutlicher wird dieser Vorteil des Verfahrens. Da jeder Faktor in fünf Konzentrationen untersucht wird, können auch parabolische Abhängigkeiten durch Polynome 2. Ordnung berechnet werden. Die tatsächlich zu untersuchenden Konzentrationsstufen und die Verteilung der Messpunkte im interessanten Konzentrationsbereich wurden mit dem Programm Cademo unter Berücksichtigung von statistischen Gesetzmäßigkeiten bestimmt. Die Auswertung der Versuche erfolgt mit dem Computerprogramm SigmaPlot 8.0 anhand von Gleichung 8.

$$v_{\max} = b_0 + b_1A + b_2B + b_{11}A^2 + b_{22}B^2 + b_{12}A * B \quad \text{Gleichung 8}$$

( $v_{\max}$  = jeweils gemessene Renaturierungsausbeute,  $b_n$  = gesuchte Parameter zur Quantifizierung der Abhängigkeiten, A und B = Konzentrationsstufen der Einflussfaktoren)

Die Parameter  $b_n$  werden durch multiple Regression berechnet. Sie ermöglichen die Berechnung der Wirkfläche und letztlich des gesuchten Optimums. Abbildung 4 illustriert den Ablauf an einem fiktiven Beispiel.



**Abbildung 4: Planung und Auswertung eines Experimentes nach einem zentral zusammengesetzten Versuchsplans 2. Ordnung.** In Abbildungsteil A sind die zu messenden Konzentrationsstufen der Faktoren A und B, mit Fragezeichen markiert. Abbildungsteil B zeigt die gemessenen Renaturierungsausbeuten. In Abbildungsteil C sind die Ergebnisse im untersuchten Konzentrationsbereich von Faktor A und B zu einer Wirkfläche zusammengefasst.

#### 4.2.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie

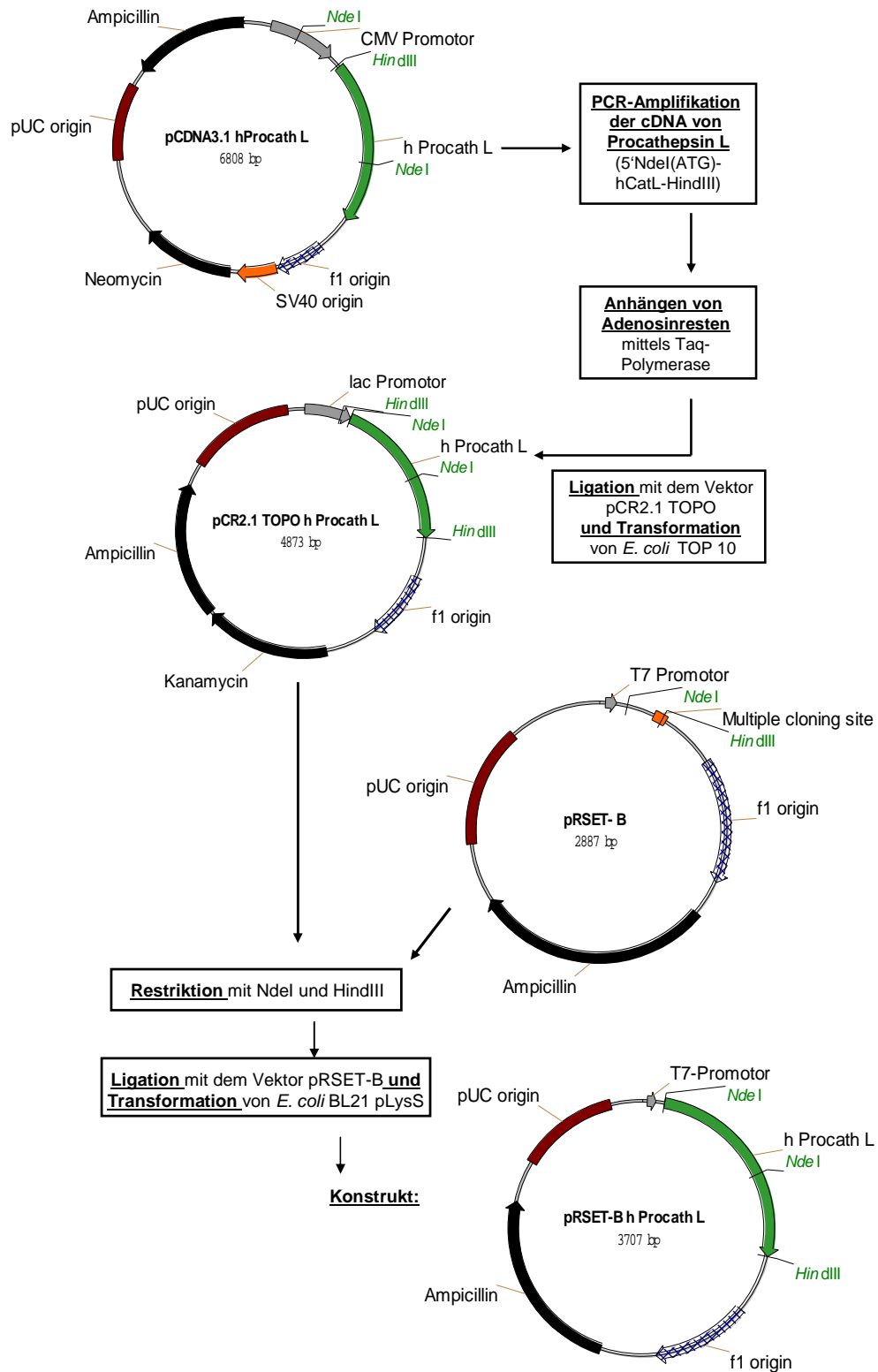
Dieses Verfahren basiert auf Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Liganden der stationären Phase der Trennsäule und hydrophoben Bereichen auf der Proteinoberfläche. Solche Wechselwirkungen werden durch hohe Ionenstärke verstärkt. Die Elution erfolgt dann bei absteigender Ionenstärke, vorteilhaft schrittweise oder durch einen Gradienten. Bei sehr fester Bindung kann noch ein Zusatz amphiphiler Verbindungen (Ethylenglykol, Triton- X 100) notwendig werden.

Die Chromatographien wurden am ÄKTA Purifier 10 durchgeführt. Zwei Pumpen förderten maximal vier verschiedene Medien über die Trennsäule. Alle diese Medien wurden vor der Verwendung filtriert und entgast. Im Durchlauf wurden die UV-Absorbanz bei 280 und 254 nm sowie die Leitfähigkeit registriert. Für Vorversuche zur Suche des optimalen Trennmediums stand ein Satz von 5 Minisäulen (HiTrap HIC-Selection Kit) zur Verfügung. Präparative Reinigungen wurden mit einer HiLoad 16/10 Phenylsepharose-HP Säule durchgeführt. Der Ablauf war im kleinen und großen Maßstab prinzipiell gleich, Einzelheiten sind im Abschnitt 5.4 beschrieben.

Zunächst wurde die Trennsäule vorbereitet. Dazu musste sie mit Regenerierungslösung (20 % Propanol in H<sub>2</sub>O) und anschließend mit Grundmedium (50 mM TRIS // 2 mM EDTA // pH 8,0) gespült werden. Um die zur Beladung vorteilhafte hohe Salzkonzentration einzustellen wurde mit Konditionierungsmedium (50 mM TRIS // 2 mM EDTA // pH 8,0 // 1 M Ammoniumsulfat) gewaschen bis sich stabile Endwerte der Leitfähigkeit eingestellt hatten. Danach konnte das mit 750 mM Ammoniumsulfat versetzte, renaturierte Procathepsin L in Mengen zwischen 300 und 800 ml über die Säule gepumpt werden. Der Säulenauftrag durfte nur bei Raumtemperatur hantiert und nicht abgekühlt werden, da ansonsten das Protein bei dieser Ammoniumsulfatkonzentration die Grenze seiner Löslichkeit überschritten hätte. Um nicht gebundene Proteine von der Säule zu entfernen, musste anschließend mit Waschmedium (50 mM TRIS // 2 mM EDTA // pH 8,0 // 1 M Ammoniumsulfat) gespült werden bis sich stabile Endwerte der UV-Absorbanz im Durchlauf eingestellt hatten. Die Durchläufe von Auftrag und Waschung wurden gesammelt und analysiert (Aktivitäts- und Proteinkonzentrationsbestimmung). Eluiert wurde mit kontinuierlich von 1 M auf 0 M fallender Ammoniumsulfatkonzentration im Grundmedium in 60 Minuten. Der Beginn der Fraktionierung erfolgte erst, nachdem die Leitfähigkeit im Eluat zu sinken begann, denn vorher ist kein Protein im Eluat zu erwarten. Anschließend musste noch mit dem salzfreien Medium nachgespült werden bis die Absorbanz im Durchlauf auf Null gefallen war.

## 5 Ergebnisse

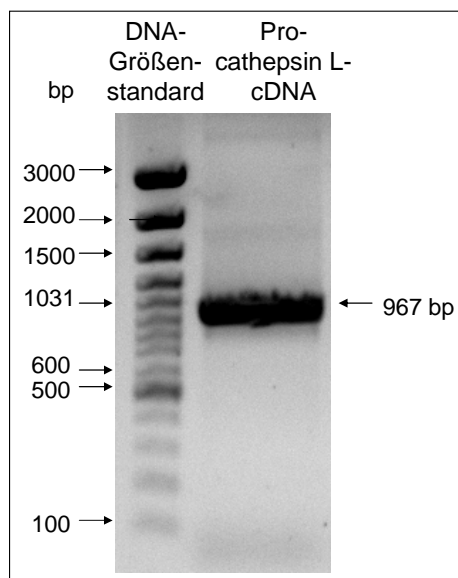
### 5.1 Expression des humanen Procathepsin L in E.coli



**Schema 1: Herstellung des Konstrukts aus dem Expressionsvektor pRSET-B und der cDNA des Procathepsin L.**

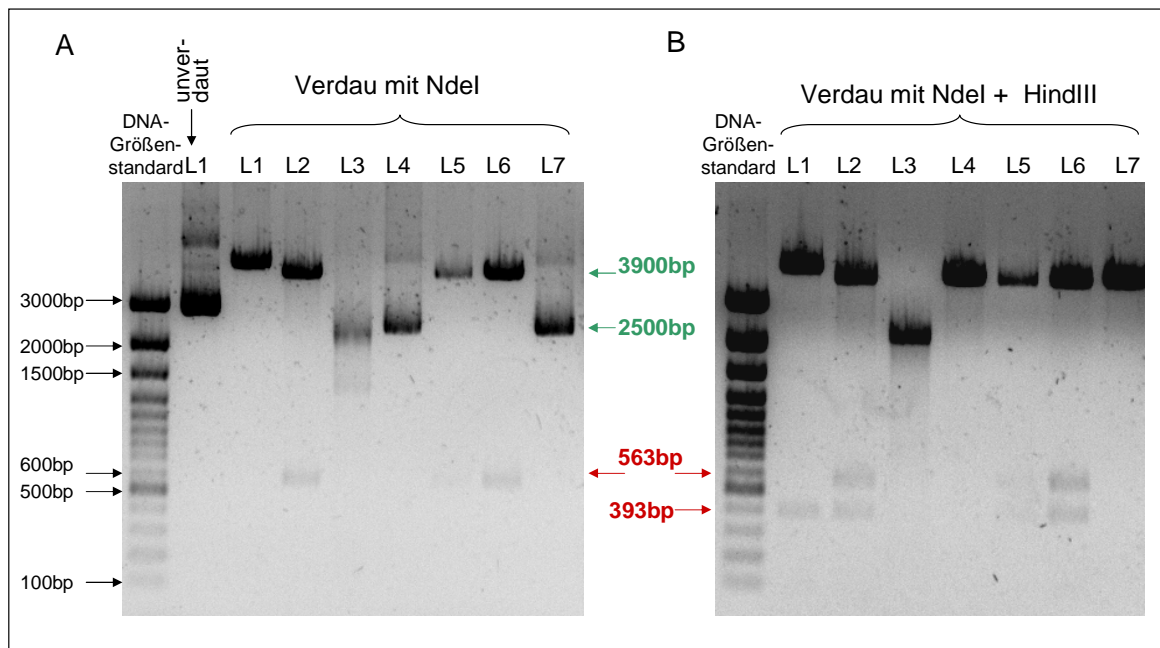
Um Procathepsin L in *Escherichia coli* zu exprimieren, musste seine Gensequenz amplifiziert und in den Vektor pRSET-B kloniert werden, der sich vom pUC-Vektor ableitet. PRSET-B ist für die Expression in *E. coli* geeignet, bietet eine NdeI-Schnittstelle im Anschluss an den T7-Promotor sowie eine Schnittstelle für HindIII am Ende der multiplen Klonierungsstelle. Vor der Ligation mit diesem Expressionsplasmid musste die Sequenz von Procathepsin L in den Klonierungsvektor pCR 2.1-TOPO eingefügt werden: das war die Voraussetzung zur Vermehrung des Inserts und zum Schneiden mit dem Restriktionsenzym NdeI, das nicht am Ende von DNA-Sequenzen angreift. Schema 1 zeigt den prinzipiellen Ablauf im Überblick, die Details werden nachfolgend erläutert.

Die Amplifizierung der Gensequenz erfolgte durch PCR, als Matrize diente ein Plasmid mit der cDNA des Procathepsin L, das von Abulizi Abudula im Institut für Biochemie I an der FSU Jena hergestellt und als pcDNA 3.1 hProcathL (p309) bezeichnet wurde (Abudula 2001). Die Primer (die Sequenz ist in der Methodik aufgeführt) waren so gewählt, dass am 5' und 3' Ende des zu amplifizierenden Gensegments Schnittstellen für NdeI und HindIII und die Codons ATG bzw. TAA für Start und Stop der Translation angefügt wurden. Die PCR wurde wie in der Methodik beschrieben durchgeführt. Damit möglichst keine zufälligen Mutationen entstehen, wurde die sehr zuverlässige Pfu-Polymerase eingesetzt, die aufgrund ihrer Korrekturlesefunktion eine sehr geringe Fehlerfrequenz besitzt (Cline et al. 1996). Die PCR-Produkte wurden anschließend im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 5)



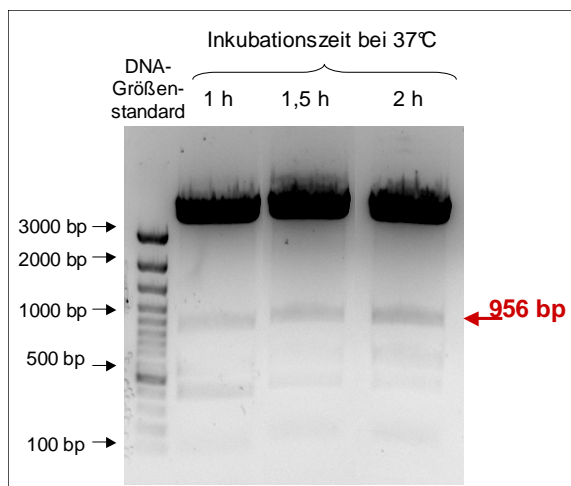
**Abbildung 5: Größenbestimmung des cDNA-Inserts von Procathepsin L in einem vorhandenen Vektor.** Die PCR der Sequenz des Procathepsin L aus dem Vektor pcDNA 3.1 h ProcathL (p309) erfolgte wie in der Methodik beschrieben mit der Pfu-Polymerase und den beiden dort aufgeführten Primern. Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese getrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Zur Größenbestimmung ist der 100 bp DNA Ladder Größenstandard mitgeführt worden.

Es zeigte sich eine starke Bande mit der erwarteten Größe von 967 bp, die aus dem Gel eluiert wurde. Die photometrische Nukleinsäurekonzentrationsbestimmung des Eluats ergab 82 ng/µl. Um die PCR-Produkte mit den beiden Restriktionsenzymen NdeI und HindIII schneiden zu können, mussten sie in einen Hilfsvektor, den pCR 2.1 TOPO eingebaut werden, denn NdeI schneidet nicht am Ende von DNA-Sequenzen. Dazu wurden mit der Taq-Polymerase Desoxyadenosinreste an die 3'-Enden der PCR-Produkte angehängt. Diese sind für die Ligation mit dem pCR 2.1 TOPO- Vektor nötig, der die komplementären Thymidin-Überhänge hat. Die Einklonierung erfolgte mit der Topoisomerase des TOPO TA Cloning-Reagenziensatzes. Um dieses Plasmid zu vermehren, wurden kompetente *E. coli*-Zellen des Klonierungsstamms *E. coli* TOP 10 transformiert und auf Ampicillin- und X-Gal-haltigen Agar-Platten bei 37°C kultiviert. Die erfolgreiche Transformation mit dem Vektor konnte mittels Blau-Weiß-Selektion nachgewiesen werden. Sieben positive Klone wurden anschließend über Nacht in Flüssigmedium kultiviert, das Plasmid isoliert und der Restriktionsanalyse unterzogen.



**Abbildung 6: Restriktionsverdau des Vektors pCR 2.1 TOPO mit der inserierten Procathepsin L-cDNA.** Die durch Minipräparation aus den sieben Clonen L1 - L7 gewonnene Vektor-DNA wurde jeweils auf zwei Ansätze verteilt, die zwei Stunden lang mit Nde I (Abbildungsteil A) bzw. NdeI und HindIII (Abbildungsteil B) verdaut wurden. Proben daraus wurden mittels Agarosegelelektrophorese getrennt, das Gel anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt. Als DNA-Größenstandard diente der 100 bp DNA Ladder. Eine unverdaute Kontrolle befindet sich nur auf dem linken Gel. Die Pfeile zwischen den Fotos markieren die Position von Spaltstücken, auf die im Text ausführlich eingegangen wird.

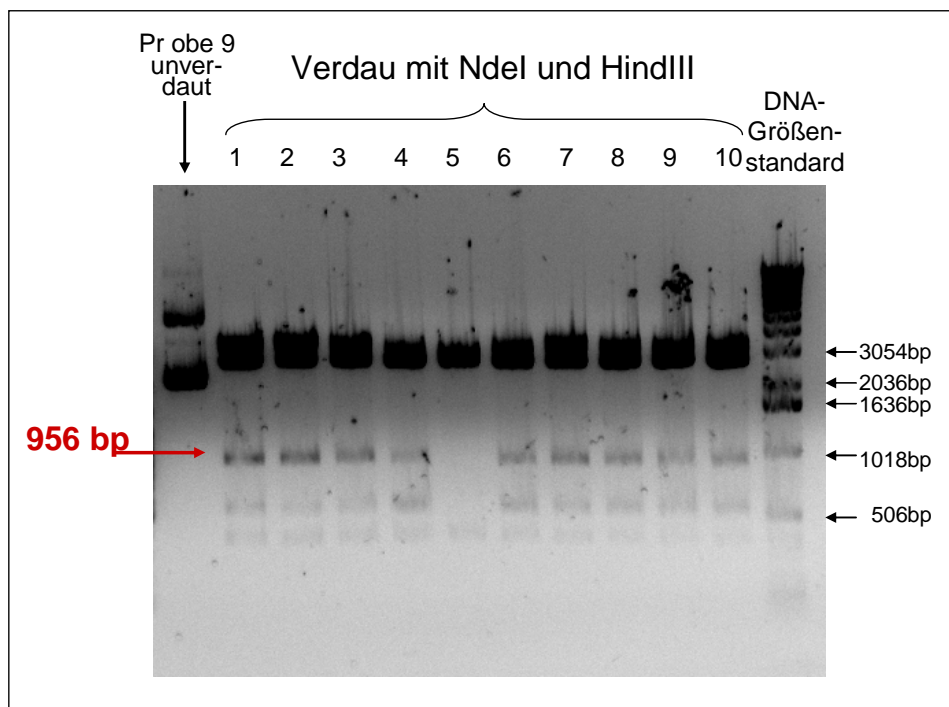
Ein Aliquot der Restriktionsansätze wurde nur mit NdeI versetzt um den Erhalt der Schnittstelle zu prüfen, ein weiteres zusätzlich mit HindIII, um die einklonierte Gensequenz auszuschneiden. Die Kontrolle wurde ohne Zusatz von Restriktionsenzymen inkubiert. Da NdeI sehr langsam arbeitet, mussten die Restriktionsansätze 2h lang inkubiert werden. Anschließend wurden die Restriktionsfragmente der sieben Ansätze analytisch aufgetrennt. Abbildung 6 zeigt ein unerwartetes Ergebnis: Nach Verdau mit NdeI allein wurde lediglich eine Bande des linearisierten Vektors (etwa 3900 bp) erwartet. Diese sollte langsamer wandern als das unverdaute Plasmid mit seiner kompakteren supercoiled-Struktur, durch die es in der Elektrophorese scheinbar kleiner wird (etwa 2500 bp). Die Bahnen L2, L5 und L6 zeigten ein identisches Bild: neben einem großen Segment entstand beim NdeI-Verdau ein kleineres mit etwa 560 bp, das zusammen mit einem noch kleineren von etwa 400 bp auch beim Verdau mit NdeI und HindIII auftritt. Beim Verdau mit beiden Restriktionsenzymen wurde neben der Bande des linearisierten und verkürzten Vektors eigentlich noch die Procathepsin L-Bande mit 956 bp erwartet. Stattdessen fanden sich die schon genannten kleineren Banden mit etwa 400 und 560 bp. Das sprach für eine NdeI-Schnittstelle in der Procathepsin L-Sequenz. Dass nur eines der beiden Fragmente auch beim Verdau mit NdeI allein auftrat, passt zu dieser Vermutung. Eine Analyse der Gensequenz von Procathepsin L bestätigte diesen Verdacht. Bei der Auswahl der Restriktionsenzyme wurde eine Schnittstelle für NdeI nach dem Basenpaar 561 im Procathepsin L übersehen. Bei den übrigen Klonen führte die Restriktionsanalyse zu verschiedenen großen Spaltprodukten, deren Größe nicht interpretiert werden konnte. Sie wurden deshalb verworfen. Um das Problem der NdeI-Schnittstelle innerhalb der Procathepsin L-Sequenz zu lösen, wurde beim Herausschneiden des Inserts mit NdeI und HindIII die Inkubationszeit stufenweise verkürzt, um einen vollständigen Verdau zu vermeiden.



**Abbildung 7: Zeitabhängigkeit des Restriktionsverdaus von pCR 2.1 TOPO mit der inserierten Procathepsin L-cDNA.** Der Verdau mit NdeI und HindIII wurde wie in der Legende zu Abbildung 6 beschrieben durchgeführt, allerdings mit unterschiedlichen Inkubationszeiten, die jeweils über den Bahnen angegeben sind.



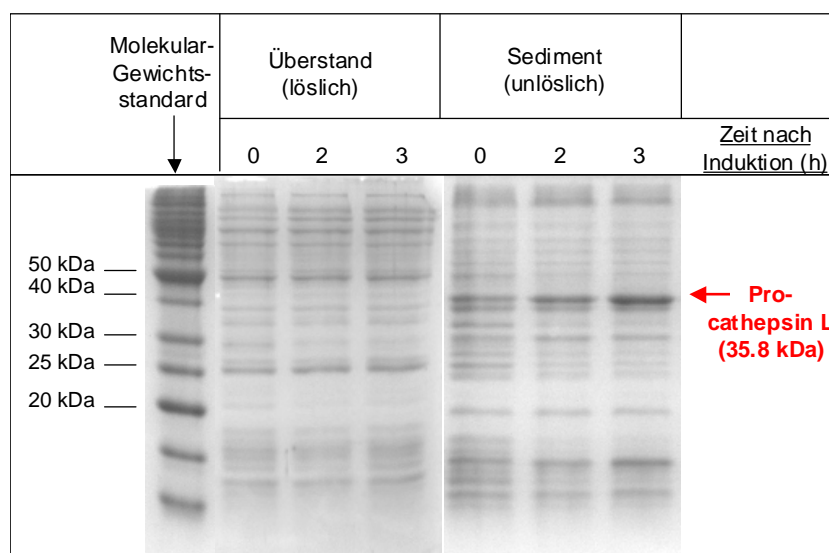
Wie Abbildung 7 zeigt, wurden drei Zeiten untersucht: 1, 1.5 und zum Vergleich auch 2 Stunden, die ja im Vorversuch zur vollständigen Zerstörung des Inserts geführt hatte. Hier ist allerdings auch noch nach 2 Stunden Inkubation das intakte Insert mit 956 bp vorhanden. Es konnte erfolgreich eluiert werden und wurde mit dem Expressionsvektor pRSET-B ligiert, der zuvor mit NdeI und HindIII geöffnet worden war. Beim Restriktionsverdau von leeren Expressionsvektoren mit zwei Enzymen kann es vorkommen, dass ein Teil nur einmal geschnitten wird und religiert, ohne das Insert aufzunehmen. Daher wurde der Vektor nach der Ligation nochmals mit BamHI inkubiert. Dieses Enzym schneidet in dem normalerweise durch NdeI und HindIII herausgeschnittenen Sequenzstück, solche linearisierten Vektoren werden in Bakterien nicht vermehrt. Zur Plasmid-Vermehrung wurde wiederum der Klonierungsstamm E. coli TOP 10 benutzt. Die in Abbildung 8 dargestellte Restriktionsanalyse von zehn Klonen mit NdeI und HindIII zeigte, dass neun Klone das vollständige Plasmid enthielten, die fehlerhafte Präparation 5 wurde verworfen.



**Abbildung 8: Kontrolle der erfolgreichen Ligation der Procathepsin L-cDNA mit dem Expressionsvektor pRSET-B.** Die Plasmid-Vermehrung erfolgte im Klonierungsstamm TOP10, aus 10 Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und mit den Restriktionsenzymen NdeI und HindIII 1,5 h lang bei 37°C inkubiert. Die entstandenen Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese getrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Als DNA-Größenstandard wurde die 100 bp DNA Ladder verwendet. Zur Kontrolle wurde ein Aliquot der Probe 9 im unverdauten Zustand aufgetragen. Der rote Pfeil zeigt auf das ausgeschnittene Insert mit der erwarteten Länge.

Die Sequenz des Konstrukts wurde nochmals kontrolliert, bevor es zur Transformation des Expressionsstammes *E. coli* BL21(DE3)pLysS benutzt wurde. Dieser Stamm ergibt in Kombination mit dem hier verwendeten pRSET-B-Vektor das „Bakteriophage T7-RNA-Polymerase-Promotor System“. Die Bakterienzellen des Expressionsstamms sind Wirt für den lysogenen Bakteriophagen  $\lambda$ DE3. Dieser besitzt das genetische Material für die T7-RNA-Polymerase, deren Expression mittels IPTG induziert wird. Die T7-Polymerase bindet an den T7-Promotor des Vektors pRSET-B und führt zur Transkription des Inserts. Normalerweise ist der T7-Promotor in der Bakterienzelle durch den lac-Repressor blockiert. Das genetische Material für diesen Repressor befindet sich ebenfalls auf dem Genom des Bakteriophagen. Durch IPTG wird der lac-Repressor abgelöst und so die Transkription gestartet.

Zunächst wurde eine Proteinexpression im analytischen Maßstab versucht. Dabei sollte auch die Frage geklärt werden, ob sich Procathepsin L, wie die früher schon untersuchten Procathepsine H und S, in Einschlusskörperchen als unlösliches Zellprotein befindet oder ob es frei im Zytosol vorliegt. Nach ausreichendem Wachstum der Bakterienkulturen wurde die Expression durch Zugabe von IPTG gestartet, danach wurden stündlich Proben entnommen. Diese Proben wurden zentrifugiert, um die Bakterien zu gewinnen. Der Zellaufschluss erfolgte durch mehrmaliges Frieren und Tauen. Dann wurde nochmals zentrifugiert. Lösliche und unlösliche Zellbestandteile wurden getrennt aufgearbeitet und mittels SDS-Page untersucht (Abbildung 9).

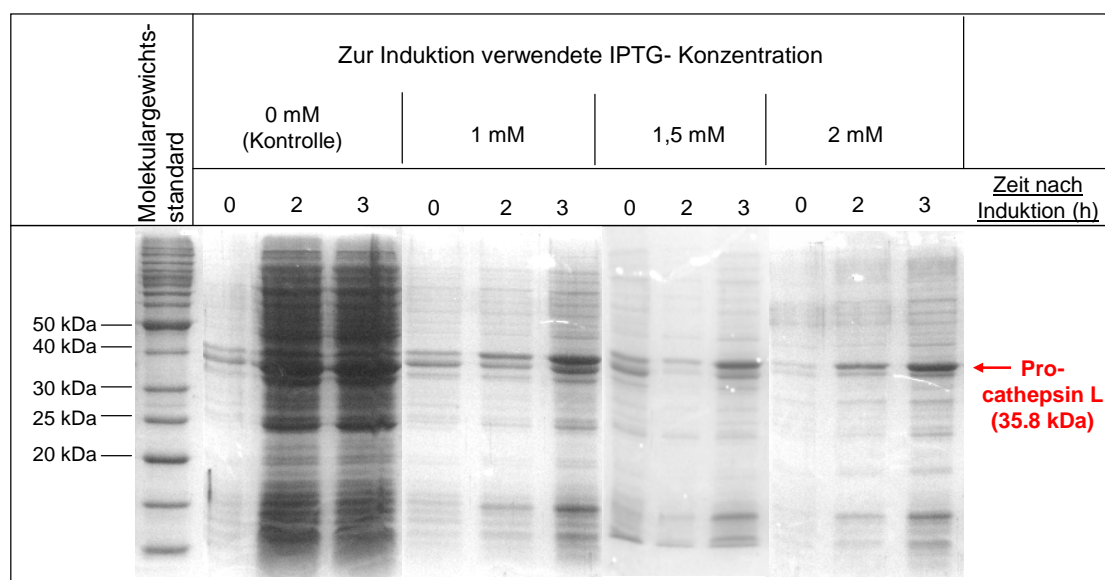


**Abbildung 9:**  
**Elektrophoretische**  
**Kontrolle der analy-**  
**tischen Procathep-**  
**sin L-Expression.**

Die Durchführung der Probeexpression ist in der Methodik ausführlich beschrieben. Nach der Induktion mit 1 mM IPTG wurden sofort sowie nach 2 und 3 Stunden Proben entnommen und nach Zellaufschluss durch Zentrifugation in lösliche und unlösliche

Zellproteine fraktioniert. Diese Fraktionen wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt und mit Coomassielösung gefärbt. Als Molekulargewichtsstandard diente die Bench Mark Protein Ladder. Der rote Pfeil zeigt die Bande, deren Intensität im Lauf der Zeit zunimmt.

In den Bahnen, in denen das unlösliche Zellprotein aufgetragen ist, ist jeweils eine Bande bei knapp 40 kDa erkennbar, die mit zunehmender Kultivierungszeit deutlich stärker wird und, wie später noch im Western Blot eindeutig nachgewiesen, dem rekombinanten Procathepsin L entspricht. In den drei Bahnen mit dem löslichen Zellprotein lässt sich eine solche mit der Zeit zunehmende Bande nicht finden. Rekombinantes Procathepsin L findet sich also in der Fraktion der unlöslichen Bakterienproteine, es liegt vermutlich in Form von Einschlusskörperchen vor. Da die Proteinexpression im Vergleich zu den anderen in der eigenen Arbeitsgruppe bereits exprimierten Procathepsinen bei dieser Probeexpression nicht sehr hoch war, wurde der Einfluss ansteigender IPTG-Konzentrationen auf die Expressionsrate untersucht: die vom Hersteller des Expressionsvektors pRSET-B empfohlene Konzentration 1 mM, sowie 1,5 mM und 2 mM. Abbildung 10 zeigt die elektrophoretische Auftrennung der unlöslichen Proteinfraktion aus den im Verlauf von 3 Stunden aus den drei Expressionskulturen entnommenen Aliquots.

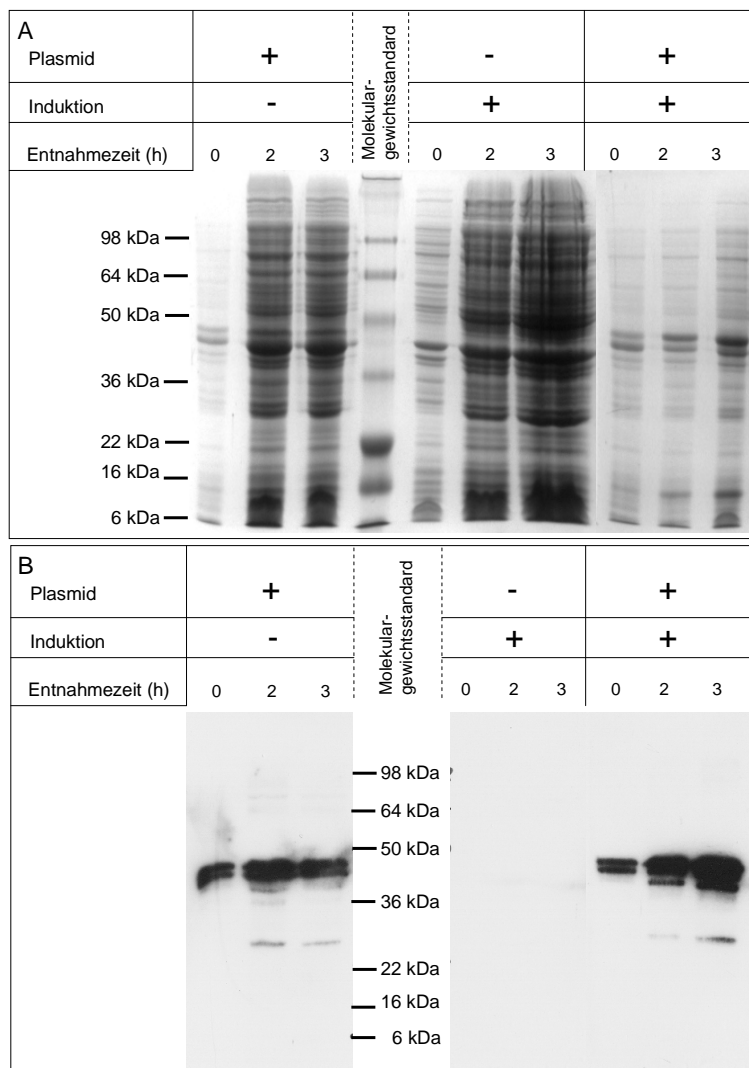


**Abbildung 10: Einfluss der IPTG-Konzentration auf die Procathepsin L-Expression transformierter Bakterienzellen.** Die Versuchsdurchführung entspricht prinzipiell der Beschreibung in der Legende zu Abbildung 9. Zum Zeitpunkt der Induktion wurde die Kultur in vier Ansätze geteilt, denen unterschiedliche IPTG-Mengen zugesetzt wurden. Nach 0, 2 und 3 Stunden wurden Proben entnommen, wie in der Methodik beschrieben aufgearbeitet und mittels SDS-Page aufgetrennt. Der rote Pfeil markiert die Procathepsin L-Bande.

Während sich bei den nicht induzierten Kontrollen nach 2 Stunden die Konzentration aller bakteriellen Proteine durch Zellvermehrung erheblich vergrößert hat, kommt es in den induzierten Ansätzen zu einer selektiven Erhöhung der Konzentration einzelner Proteine, darunter auch Procathepsin L. Die Intensität der Procathepsin L-Bande ist bei allen drei IPTG-Konzentration aber etwa gleich - IPTG hat also in diesem Konzentrationsbereich

keinen Einfluss auf die Expressionsrate. Es fällt auf, dass schon bei 0 Stunden eine deutliche Procathepsin L-Bande sichtbar ist, also auch ohne Induktor schon Procathepsin L exprimiert wird. Die Ursache ist sicherlich ein nicht völlig reprimierter Promotor.

Die Identität des Procathepsin L sollte mit einem spezifischen Antikörper im Western-Blot nachgewiesen werden. Dazu wurde eine analytische Expression wie eben beschrieben durchgeführt und zusätzlich eine Kultur des nicht transformierten Expressionsstamms E. coli BL21(DE3)pLys S als Kontrolle mitgeführt. Es wurden zeitgleich jeweils 2 Proben entnommen und in gleicher Weise mit separaten Gelen elektrophoretisch getrennt. Ein Gel wurde mit Coomassie gefärbt, es zeigt die erfolgreiche Expression (Abbildung 11 A). Das zweite Gel wurde auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet, mit einem spezifischen Antikörper inkubiert und mit einem sekundären Antikörper entwickelt (Abbildung 11 B).

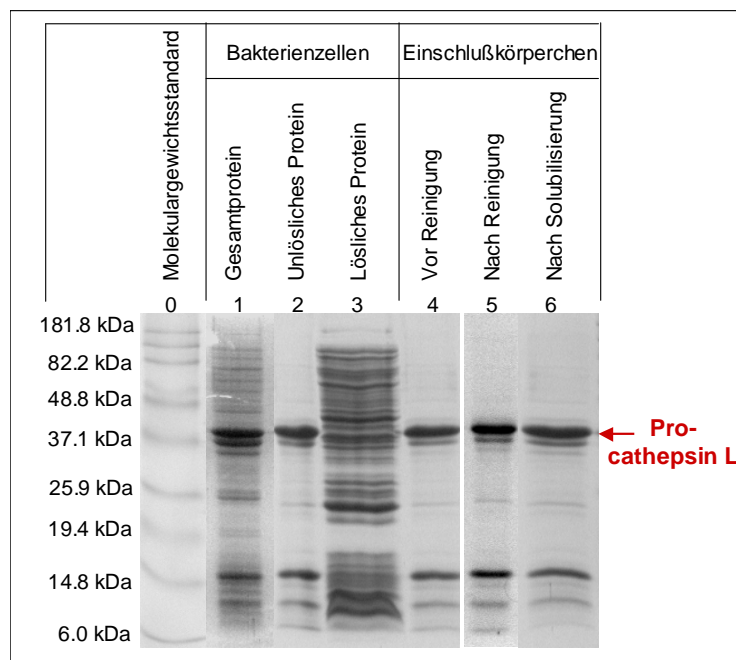


**Abbildung 11: Western Blot zur Procathepsin L-Identifikation.** Der prinzipielle experimentelle Ablauf erfolgte wie in der Legende zu Abbildung 10 beschrieben. Drei Kulturen des Bakterienstamms E. coli BL21 (DE3) pLysS wurden wie in der Methodik beschrieben ange-  
setzt. Die jeweils realisierte Kombination aus Transformation und Induktion ist tabellarisch in die Abbildung integriert.

Sofort sowie 2 und 3 Stunden nach dem Induktionszeitpunkt wurden Proben entnommen, aufgearbeitet, anschließend je zur Hälfte auf zwei Gele aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard diente der SeeBlue Plus 2 Pre-Stained Standard. Abbildungsteil A zeigt das Ergebnis der Coomassiefärbung, Abbildungsteil B den mit einem Procathepsin L-Antikörper entwickelten Blot. Die Details sind im Methodenteil beschrieben.

In den Kontrollen (BL21pLysS, ohne Plasmid, IPTG-induziert) erkannte der Antikörper erwartungsgemäss kein Protein. In den Proben aus der mit IPTG induzierten Kultur der transformierten Bakterien (pRSET-B Procath L, induziert) wird Procathepsin L vom Antikörper erkannt. Man kann gut die Intensitätszunahme mit der Zeit erkennen. Es zeigt sich erneut, dass bereits vor der Induktion eine gewisse Expression stattfindet. Das bestätigt auch das Ergebnis der nicht induzierten Proben, die im Blot eindeutig die schlechte Repression im verwendeten Expressionssystem zeigen. In den transformierten Bakterien sind immunologisch auch Procathepsin L-Fragmente nachzuweisen, eine schwache Bande direkt unter dem Procathepsin L, die bereits in den Coomassie-gefärbten Gelen auffiel, sowie eine weitere Bande bei etwa 28 kDa.

Nach den erfolgreichen Probeexpressionen und dem immunologischen Procathepsin L-Nachweis im unlöslichen Zellprotein startete die erste präparative Expression. Die Zellernte durch Zentrifugation fand drei Stunden nach Induktion mit 1 mM IPTG statt. Anschließend wurden die Einschlusskörperchen wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben gewonnen, mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigt und in 6 M Guanidinhydrochlorid solubilisiert. Vor bzw. nach den einzelnen Schritten wurden Proben entnommen und elektrophoretisch aufgetrennt. Abbildung 12 gibt einen Überblick über die Ergebnisse:



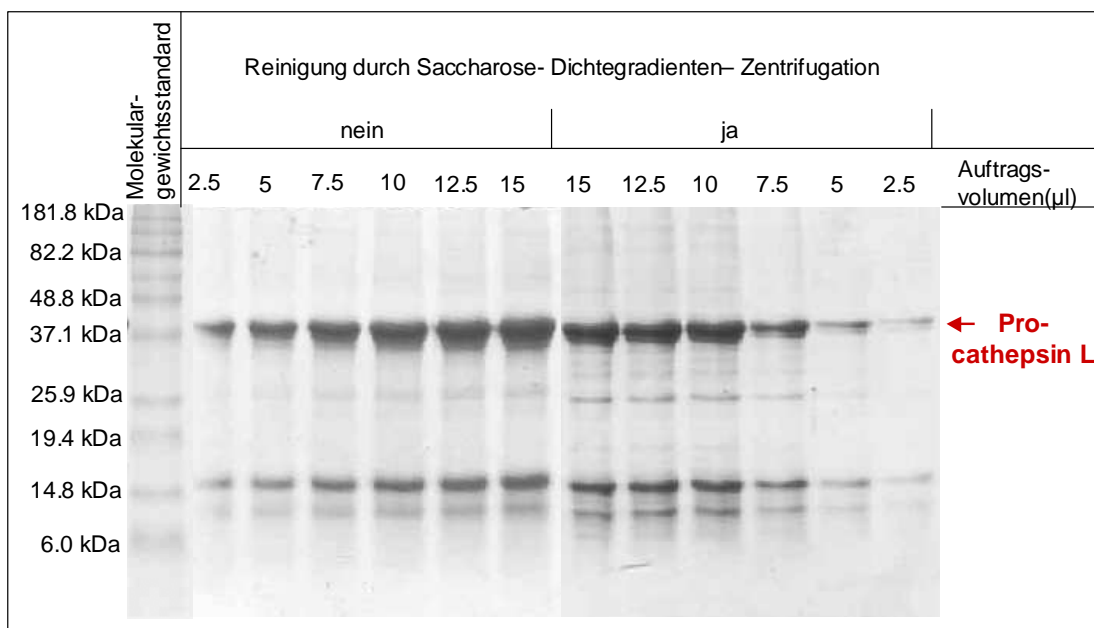
**Abbildung 12: Elektrophoretische Kontrolle der präparativen Procathepsin L-Expression.**

Der detaillierte Ablauf der präparativen Expression ist in der Methodik beschrieben. Drei Stunden nach der Induktion mit 1 mM IPTG wurden die Zellen durch Zentrifugation gewonnen, mit Ultraschall aufgeschlossen und die unlöslichen Zellproteine von den löslichen durch eine zweite Zentrifugation getrennt. Die unlöslichen Zellproteine (Einschlusskörperchen) wurden mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigt und durch

vollständige Denaturierung in Lösung gebracht. Die Elektrophorese erfolgte über 45 Minuten bei 200 V unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel. Zur Molekulargewichtsmarkierung diente der BenchMark Pre-Stained Protein Ladder. Die Proteinbanden wurden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

Auf Bahn 1 wurde das gesamte Protein der Bakterienzellen nach der Ernte, also drei Stunden nach Induktion der Procathepsin L-Expression aufgetragen. Man erkennt, dass Procathepsin L das dominierende Protein in den Zellen ist. Nach der Zellyse durch Ultraschall wurden unlösliche (Bahn 2) und lösliche Proteine (Bahn 3) durch Zentrifugation getrennt. Procathepsin L befindet sich ausschließlich in der unlöslichen Proteinfraction, die nach den allgemeinen Erfahrungen bei der bakteriellen Expression rekombinanter Proteine vor allem Einschlusskörperchen enthält. Sie wurden durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigt (Bahn 5). Auf Bahn 6 wurde ein durch Ethanol-fällung (Coligan et al. 2003) entsalztes Aliquot der durch Behandlung mit 6 M Guanidinhydrochlorid solubilisierten Einschlusskörperchen getrennt. Vergleicht man die Bahnen 2, 4, 5 und 6, so sind kaum Unterschiede im Bandenmuster zu erkennen. Daraus kann man schließen, dass nach der Zentrifugation der löslichen Zellproteine die Procathepsin L-haltigen Einschlusskörperchen schon in weitgehend sauberer Form vorliegen und durch die in der Literatur zur Reinigung von Einschlusskörperchen empfohlene Dichtegradienten-Zentrifugation keine weiteren Fremdproteine verschwinden. Die Einschlusskörperchen bestehen aber offensichtlich noch aus weiteren Proteinen, die ebenfalls nach IPTG-Induktion exprimiert werden (Vergleich mit Abbildung 9, 10, 11). Alle in den Einschlusskörperchen enthaltenen Proteine lassen sich durch die Behandlung mit 6 M Guanidinhydrochlorid in Lösung bringen.

Nach diesem überraschenden Ergebnis sollte die Effektivität der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation, die, wie in der Methodik beschrieben, mit einem hohen Aufwand verbunden ist, nochmals gesondert überprüft werden. In der zweiten präparativen Expression wurde daher der Ansatz im Verlauf der Aufarbeitung zwischenzeitlich geteilt und nur eine Hälfte über Saccharose-Gradienten gereinigt. Abbildung 13 zeigt das Ergebnis der Polyacrylamidgelelektrophorese, mit der beide Verfahren verglichen wurden. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation die Menge an Fremdproteinen nicht vermindert. Das bedeutet, dass bei der Expression von rekombinantem Procathepsin L auf diesen Schritt verzichtet werden kann.



**Abbildung 13: Einfluss der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation auf die Reinheit der Procathepsin L-haltigen Einschlusskörperchen.** Ein präparativer Expressionsansatz wurde bis zum Schritt der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgearbeitet und dann geteilt. Nur eine Hälfte wurde der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation unterzogen. In beiden Fällen wurden dann die Einschlusskörperchen mit 6 M Guanidinhydrochlorid aufgelöst und Aliquots durch Ethanolfällung für die Elektrophorese aufbereitet. Sie wurden mit Probenpuffer so nachverdünnt, dass sich wieder eine annähernd gleiche Proteinkonzentration in der gereinigten und ungereinigten Probe ergab. Die aufgetragenen Mengen sind jeweils über den Bahnen angegeben. Als Größenstandard diente die Bench Mark Pre-Stained Protein Ladder.

Nach der Expression und Aufbereitung war das rekombinante Procathepsin L in 6 M Guanidinhydrochlorid gelöst. Guanidinhydrochlorid destabilisiert hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken, die nicht nur für die Tertiär- und Sekundärstruktur nativer Proteine verantwortlich sind, sondern auch den Zusammenhalt entfalteter Proteine in Einschlusskörperchen bedingen. Aggregate aus Proteinen mit SH- Gruppen können zusätzlich durch Ausbildung von Disulfidbrücken stabilisiert sein. Durch zweistündige Inkubation mit 50 mM DTT bei Raumtemperatur konnten diese gelöst werden. Diese Vorbehandlung steigerte die Ausbeute bei der nachfolgenden Renaturierung um ein Drittel.

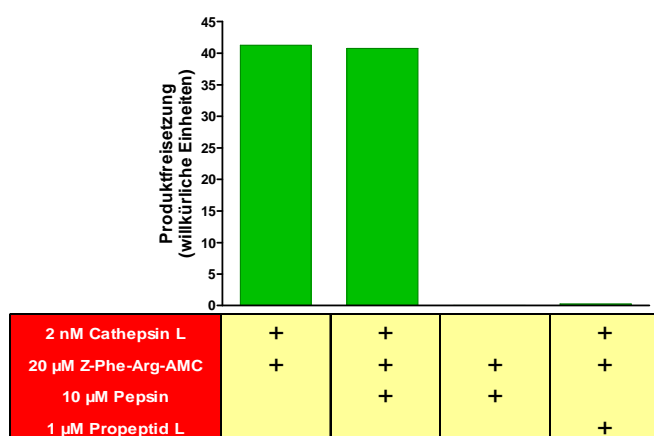


## 5.2 Heterokatalytische analytische Prozessierung von Procathepsin L

Die Messung der Aktivität ist das sicherste, einfachste und empfindlichste Verfahren zum Nachweis der Wiederherstellung der Struktur eines Enzyms und damit zur Beurteilung des Renaturierungserfolgs. Procathepsin L hat aber allenfalls eine minimale enzymatische Aktivität. Deshalb muss es vor der Aktivitätsmessung in das reife Enzym umgewandelt, also seine Proregion entfernt werden. Diese Prozessierung kann grundsätzlich auf zwei Wegen geschehen: autokatalytisch bei saurem pH oder heterokatalytisch durch die Zerstörung der Proregion durch eine andere Protease, üblicherweise Pepsin (Brömme et al. 2004).

Zur Autoprocessierung von Procathepsin L muss der pH auf  $\leq 5,5$  gesenkt werden. (Mason et al. 1992, Nomura et al. 1997, Ishidoh und Kominami 1994). Da dabei kein Zusatz einer anderen Protease notwendig ist, ist diese Methode sehr gut zur präparativen Prozessierung geeignet und wird deshalb auch an entsprechender Stelle in Abschnitt 5.5 beschrieben.

Der heterokatalytische Abbau der Proregion durch Pepsin wurde bereits erfolgreich zur analytischen Prozessierung des Procathepsin S (Kramer in Vorbereitung) sowie zum Clearing, dem Abbau des Propeptids im Enzym-Propeptid-Komplex, bei Cathepsin K und S (Kleint 2004, Sehmisch 2005) eingesetzt. Vor Anwendung der Pepsin-katalysierten Prozessierung prüfte ich, ob die Aktivität von Cathepsin L durch Pepsin beeinflusst und ob das zur Aktivitätsmessung verwendete fluorogene Peptidsubstrat Z-Phe-Arg-AMC durch Pepsin angegriffen wird. Abbildung 14 zeigt die Einzelheiten und Ergebnisse des entsprechenden Experiments.

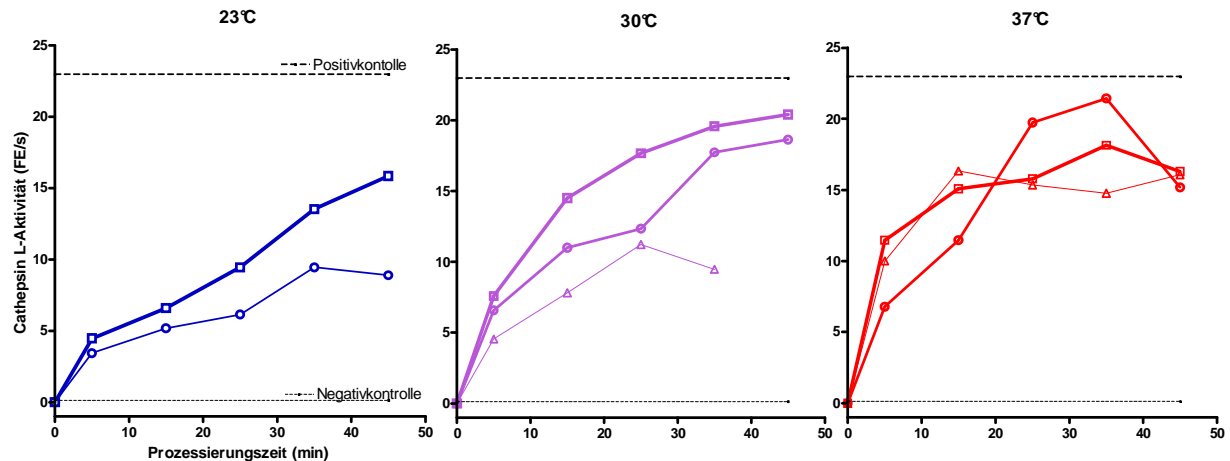


**Abbildung 14: Einfluss von Pepsin auf den Aktivitätstest von Cathepsin L.** Zur Bestimmung der Cathepsin L-Aktivität wurden Mikrotests, wie im Abschnitt 4.2.3 beschrieben, durchgeführt. Um die Pepsinwirkung zu erfassen, wurde statt des Phosphatpuffers pH 6,0 ein Zitratpuffer pH 4,0 in gleicher Konzentration eingesetzt. Die Endkonzentrationen der weiteren Zusätze sind unter der Grafik tabellarisch aufgelistet. Die Geschwindigkeit der Produktbildung wurde kinetisch gemessen und durch lineare Regression berechnet.



Bei Anwesenheit von Pepsin im Testmedium wurden die gleichen Aktivitäten gemessen wie ohne Pepsinzusatz. Dies beweist, dass Pepsin keinerlei Auswirkungen auf die Funktion des reifen CathepsinL besitzt. Die alleinige Inkubation von Pepsin mit dem Substrat führt nicht zur Produktbildung, also ist Pepsin nicht in der Lage, Z-Phe-Arg-AMC zu spalten. Im letzten Versuch wurde durch Zusatz von 1  $\mu\text{M}$  Propeptid zum Cathepsin L dessen Hemmwirkung überprüft.

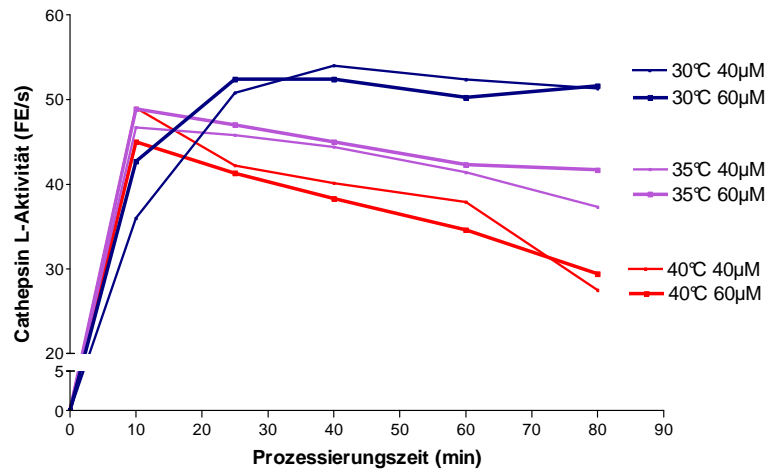
Das waren ideale Voraussetzungen, um dieses Verfahren auch für die analytische Procathepsin L-Prozessierung zu nutzen. Das Ziel der Optimierung der analytischen Prozessierungsbedingungen war es, in kurzer Zeit eine möglichst hohe Wiederfindung an Cathepsin L-Aktivität zu erreichen. Indirekt hat auch die Prozessierungszeit Einfluss auf die Wiederfindung, denn je schneller dieser Umwandlungsprozess abgeschlossen ist, desto früher kann die Aktivitätsmessung erfolgen und desto geringer ist der mit steigender Inkubationszeit unvermeidliche Aktivitätsverlust des prozessierten Enzyms durch Autolyse. Den stärksten Einfluss auf die Prozessierungsgeschwindigkeit haben vermutlich die Procathepsin L-Konzentration, die Temperatur und die Pepsin-Aktivität. Letztere ist wiederum eine Funktion der Enzymkonzentration und des pH-Wertes. Da Cathepsin L bei  $1,5 < \text{pH} < 2,5$ , dem pH-Optimum des Pepsins, nicht mehr stabil ist (Mason et al. 1985), wurde für die analytische Prozessierung ein pH von 4,0 festgelegt. Bei diesem pH prüfte ich bei Temperaturen zwischen 23°C und 37°C den Einfluss der Pepsinkonzentration (10 – 40  $\mu\text{M}$ ) auf die Geschwindigkeit des Propeptidabbaus im Cathepsin L-Propeptid-Komplex (Abbildung 15). Dieser Kompromiß war erforderlich, da zu Beginn des Optimierungsverfahrens noch kein renaturiertes Procathepsin L zur Verfügung stand. Zur Herstellung des Cathepsin L-Propeptid-Komplexes wurde kommerzielles Cathepsin L mit seinem Propeptid inkubiert. Abbildung 15 zeigt, dass mit steigender Pepsinkonzentration die Prozessierungsausbeute wächst. Gleiches gilt für die Temperatur, die Unterschiede zwischen 30°C und 37°C sind aber vergleichsweise gering.



**Abbildung 15: Inaktivierung des Cathepsin L-Propeptids in Abhängigkeit von Pepsinkonzentration, Temperatur und Zeit.** Kommerzielles humanes Cathepsin L wurde bei pH 6,0 mit 1 µM Propeptid vollständig inhibiert. Daraus wurden Aliquots entnommen, mit Prozessierungspuffer (pH 4,0), dem 10 (Δ), 20 (O) oder 40 (□) µM Pepsin zugesetzt waren, verdünnt und bei 23°C (blau), 30°C (violett) oder 37°C (rot) inkubiert. Die Cathepsin L-Aktivität in diesen acht Ansätzen wurde über einen Zeitraum von 45 Minuten in Mikrotests ermittelt. Als Positivkontrolle diente Cathepsin L in der gleichen Konzentration ohne Propeptid-Zusatz, bei der Negativkontrolle enthielt der Prozessierungspuffer kein Pepsin.

Unter allen Bedingungen zeigt sich zunächst ein Anstieg der Enzymaktivität. Bei hohen Temperaturen fällt die Kurve nach Erreichen eines Maximums aber in einigen Fällen wieder ab. Dies ist vermutlich durch Autoproteolyse des Enzyms bedingt. Bezogen auf die Positivkontrolle liegt die maximale Wiederfindung bei 90%. Rasch erfolgte der Propeptidabbau bei hohen Konzentrationen von Pepsin und hoher Temperatur. Unter den übrigen Bedingungen wird nach 45 Minuten noch kein Endzustand erreicht, so dass eine endgültige Aussage zur optimalen Pepsinkonzentration und Prozessierungstemperatur an dieser Stelle noch nicht möglich ist. Zur Auswertung der allerersten Renaturierungsversuche von rekombinant hergestelltem Proenzym habe ich diese Ergebnisse berücksichtigt, dann konnte ich Procathepsin L einsetzen, um die Prozessierungsbedingungen systematisch weiter zu optimieren. Abbildung 16 zeigt den entsprechenden Versuch. Die Prozessierung des rekombinant hergestellten Enzyms verläuft deutlich schneller als das Clearing im Vorversuch. Das liegt vermutlich daran, dass bei Clearing ein erheblicher Überschuss an Propeptid im Vergleich zum Enzym eingesetzt worden war, um die vollständige Hemmung zum Startzeitpunkt zu gewährleisten. Im Procathepsin L ist das molekulare Verhältnis zwischen Enzym und Inhibitor zwangsläufig 1:1; jede Hydrolyse einer Proregion setzt ein aktives Enzymmolekül frei, das seinerseits den Prozessierungsvorgang autokatalytisch beschleunigt.

**Abbildung 16: Einfluss von Pepsinkonzentration, Temperatur und Prozessierungszeit auf die Prozessierung von Procathepsin L.** Procathepsin L wurde bei pH 4,0 mit 40  $\mu$ M bzw. 60  $\mu$ M Pepsin bei drei unterschiedlichen Temperaturen prozessiert: 30°C (blau), 35°C (violett) und 40°C (rot). Dazu wurden Aliquots aus dem renaturierten Ansatz 1:10 im Prozessierungsmedium verdünnt. Der Erfolg der Prozessierung wurde durch Aktivitätsmessungen (Mikrotests) in Aliquots ermittelt, die in einem Zeitraum von 80 Minuten entnommen wurden.

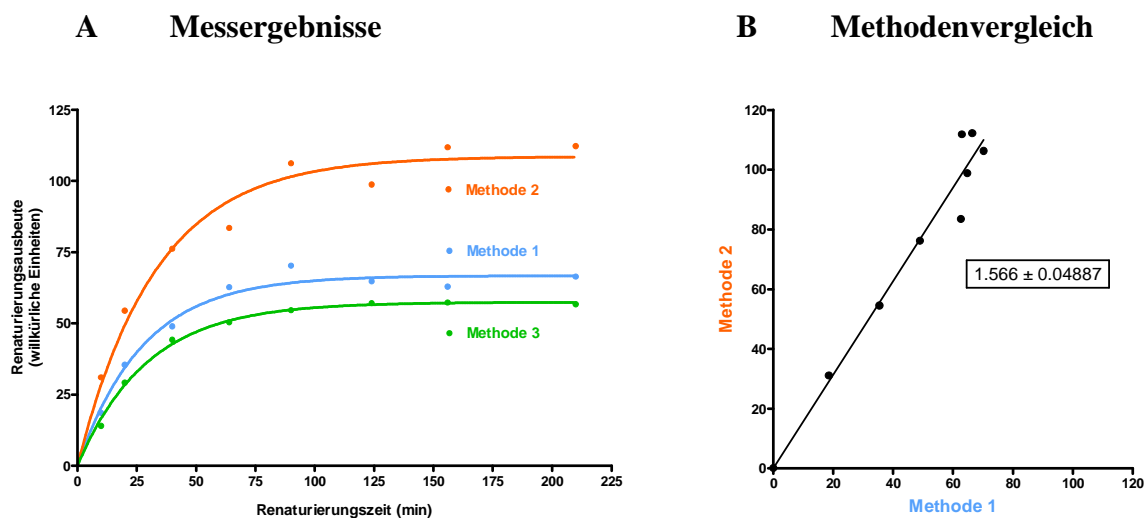


Wegen der fallenden Kurven bei Temperaturen oberhalb von 30°C ist zu vermuten, dass es auch hier zu einer erheblichen Autolyse des Enzyms kommt. Diese Erklärung ist auch deshalb sehr wahrscheinlich, weil der Aktivitätsverlust mit steigender Proenzymkonzentration immer früher einsetzt (Experiment nicht dargestellt). Das ist typisch für eine bimolekulare Reaktion. Eine thermische Inaktivierung infolge der bekannten Temperaturempfindlichkeit von Proteinen wäre konzentrationsunabhängig. Es ist wahrscheinlich, dass eine Temperaturerhöhung von 30°C auf 40°C nicht nur die proteolytische Aktivität verdoppelt, sondern auch die Raumstruktur des Enzyms so lockert, dass es für einen proteolytischen Angriff empfindlicher wird. Bei einer Temperatur von 30°C ergeben sich aber unabhängig von der Pepsinkonzentration sowohl eine hohe Ausbeute als auch eine weitgehend stabile Enzymaktivität im Prozessierungsansatz. Nach einer Prozessierungszeit von mindestens 25 Minuten ergibt sich unter diesen Bedingungen eine weitgehend stationäre Ausbeute über etwa eine Stunde. Das ist ein entscheidender Vorteil. Die maximalen Aktivitäten bei 40  $\mu$ M und 60  $\mu$ M Pepsin unterscheiden sich bei 30°C nur unwesentlich. Für die folgenden analytischen Prozessierungen wurden daher eine Pepsinkonzentration von 40  $\mu$ M, eine Temperatur von 30°C und eine Prozessierungszeit von 30 - 40 Minuten festgelegt. Damit war erst einmal eine einfache und reproduzierbare Methode gefunden, um die Renaturierungsausbeute von Procathepsin L durch Enzymaktivitätsmessung zu bestimmen.

Mit dem erfolgreichen Fortgang der Optimierung der Renaturierungsbedingungen überschritten die mit diesem Verfahren freigesetzten Enzymaktivitäten aber die obere Grenze des Messbereiches des Mikrotiterplattentestes, so dass eine Nachverdünnung notwendig wurde.

Verdünnungsverhältnis / Verdünnungsmedium bei ...	Methode 1	Methode 2	Methode 3
... Renaturierung	1:100 / Rena-Medium		1:2200 / Rena-Medium
... Nachverdünnung	1:22 (4 $\mu$ l + 84 $\mu$ l) / Rena-Medium		
... Prozessierung	1:10 (4 $\mu$ l + 36 $\mu$ l) / Proz-Medium	1:22 (4 $\mu$ l + 84 $\mu$ l) / Proz-Medium	1:10 (4 $\mu$ l + 36 $\mu$ l) / Proz-Medium
... Messung	1:7.25 (40 $\mu$ l + 250 $\mu$ l) / Testmedium	1:72.5 (4 $\mu$ l + 286 $\mu$ l) / Testmedium	1:7.25 (40 $\mu$ l + 250 $\mu$ l) / Testmedium
Gesamtverdünnung	1:159500		

**Schema 2: Zur Quantifizierung des Renaturierungserfolgs von Procathepsin L geprüfte Arbeitsabläufe.**



**Abbildung 17: Einfluss des Arbeitsablaufs nach Schema 2 auf die Messung der Renaturierungsausbeute von Procathepsin L.** Die Renaturierung von Procathepsin L wurde in zwei Ansätzen durchgeführt. Im ersten betrug die Verdünnung im Renaturierungsmedium 1:100, im zweiten 1:2200. Im Zeitraum von 210 Minuten wurden Aliquots (4  $\mu$ l) aus den Ansätzen entnommen. Vor der Aktivitätsmessung wurden diese Aliquots, wie in Schema 2 dargestellt, in verschiedener Weise, nachverdünnt. Bei allen drei Methoden war die Gesamtverdünnung identisch und die abschließende Aktivitätsmessung erfolgte in gleicher Weise in Mikrotiterplatten. Abbildungsteil A zeigt den Zeitverlauf der Renaturierung, wie er aus den Aktivitätsmessungen ermittelt wurde. Abbildungsteil B stellt die Messwerte von Methode 1 und 2 gegenüber. Durch lineare Regression wurde ein Faktor von  $1,566 \pm 0,05$  ermittelt, um welchen sich die beiden Methoden zugunsten Methode 2 unterscheiden.

Ich verglich deshalb die drei im Schema 2 dargestellten Verdünnungsabläufe, und stellte fest, dass das Ergebnis der analytischen Prozessierung in gewissem Umfang vom Mischungsverhältnis zwischen den Aliquots, die dem Renaturierungsansatz entnommen worden waren und dem Prozessierungsmedium abhängt (Abbildung 17). Man erkennt bereits in Abbildungsteil 17A deutlich, dass die Messwerte bei der Nachverdünnung mit Prozessierungsmedium (Methode 2) höher sind, als die Messwerte, die sich bei Nachverdünnung mit Renaturierungsmedium (Methode 1) ergeben. Der Methodenvergleich durch lineare Regression im Abbildungsteil 17B zeigt, dass ein systematischer Unterschied mit dem Proportionalitätsfaktor 1,566 zwischen beiden Vorgehensweisen besteht. Die Ursachen dieses Phänomens wurden zwar nicht genauer untersucht, man kann jedoch annehmen, dass einzelne Zusätze im Renaturierungsmedium die Prozessierung und vielleicht auch die Aktivitätsmessung negativ beeinflussen. Sie werden bei Methode 2 stärker verdünnt. Methode 1 und 3 lieferten annähernd gleiche Ergebnisse, das stützt die genannte Vermutung, denn in beiden Fällen gelangen störende Renaturierungszusätze in der gleichen Konzentration in die Prozessierungs- und Messansätze. Ein weiterer Aspekt, der die unterschiedlichen Aktivitätswerte zwischen Methode 1 und 2 erklären könnte, ist die bessere Reproduzierbarkeit der Reaktionsbedingungen (pH, Pepsin- und ggf. Substratkonzentration) durch die um den Faktor 10 stärkere Verdünnung bei Prozessierung und Messung. Da Methode 2 die eindeutig besten Ergebnisse brachte, wurde sie bei den späteren Messungen beibehalten. Die Tatsache, dass zuvor Methode 3 zur Prozessierung der Aliquots nach analytischen Renaturierungen verwendet wurde, führte nicht zu fehlerhaften Schlussfolgerungen, denn zwischen den Ergebnissen der drei Methoden gibt es einen linearen Zusammenhang. Damit ist die Vergleichbarkeit innerhalb einer Versuchsreihe immer gewährleistet. Für die finale Charakterisierung der Enzymchargen wurden die Aktivitätsbestimmungen nach starker Verdünnung ( $>1:100$ ) mit Testpuffer durchgeführt, so dass dieses Problem nicht existierte.

### **5.3. Renaturierung von Procathepsin L**

Trotz wachsender Kenntnisse über die der Proteinrenaturierung zugrunde liegenden Vorgänge (Clark et al. 1999, Kiefhaber et al. 1991, Willis et al. 2005), ist systematisches Probieren zur Optimierung von physikalischen und chemischen Einflussfaktoren nicht zu umgehen. Im Einzelnen sind das Temperatur und Proteinkonzentration, pH-Wert und Puffersalze, Redoxpuffersystem und weitere Zusätze zum Renaturierungsmedium beispielsweise Neutralsalze, Aminosäuren, Glycerol, Saccharose und Detergenzien. Im gegebenen Fall, bei

der Renaturierung von Procathepsin L, konnte ich auf systematische Versuche zur Ermittlung der optimalen Renaturierungsbedingungen von Procathepsin S und K zurückgreifen (Kramer in Vorbereitung, D'Alessio 1999).

Zur Wirkung einzelner oder Gruppen von Faktoren habe ich durch das Studium ausgewählter Kapitel der Handbücher „Protein Structure“ (Timasheff et Arakawa 1997) und insbesondere „Protein Function“ (Rudolph et al. 1997) und einzelner Originalarbeiten (Smith et Gottesman 1989, Yamamoto et al. 1999, Clark et al. 1999) die folgenden Vorstellungen entwickelt:

Procathepsin L verfügt über 3 Disulfidbrücken, auf deren korrekter Bildung der Renaturierungserfolg basiert. Reduziertes (GSH) und oxidiertes Glutathion (GSSG) bilden im Renaturierungsansatz ein Redoxsystem, welches in der Lage ist, die Lösung inkorrekt ausgebildeter Disulfidbrücken sowie die Bildung neuer Disulfidbrücken zu fördern. Die Wirkung der Redoxpuffer beruht auf der Ionisation der SH-Gruppen und ist deshalb pH-abhängig (Woycechowsky et al. 2003, Willis et al. 2005). Daher wurde die Optimierung der Konzentrationen von GSSG und GSH sowie des pH-Wertes des Renaturierungsmediums als die zentrale Aufgabe angesehen.

Von einigen Substanzen ist bekannt, dass sie den Renaturierungserfolg steigern können, indem sie die native Struktur eines Proteins stabilisieren. Das Kohlenhydrat Saccharose, der Polyalkohol Glycerol und Salze wie Magnesiumchlorid, Ammoniumsulfat und Magnesiumsulfat erhöhen die Oberflächenspannung des Wassers oder unterliegen einer Ungleichverteilung in der Umgebung der Proteinoberfläche und schaffen damit eine Situation, die eine kompakte Proteinstruktur mit geringer Oberfläche thermodynamisch begünstigt und der Entfaltung entgegenwirkt (Timasheff et Arakawa 1997, Rudolph et al. 1997).

Auch Substanzen, welche die Proteinstruktur labilisieren, wie Guanidinhydrochlorid und Arginin, zeigen manchmal positive Effekte. Die Guanidinogruppe lockert hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken, so lösen sich eventuelle Fehlfaltungen und der Weg zur nativen Struktur wird geebnet.

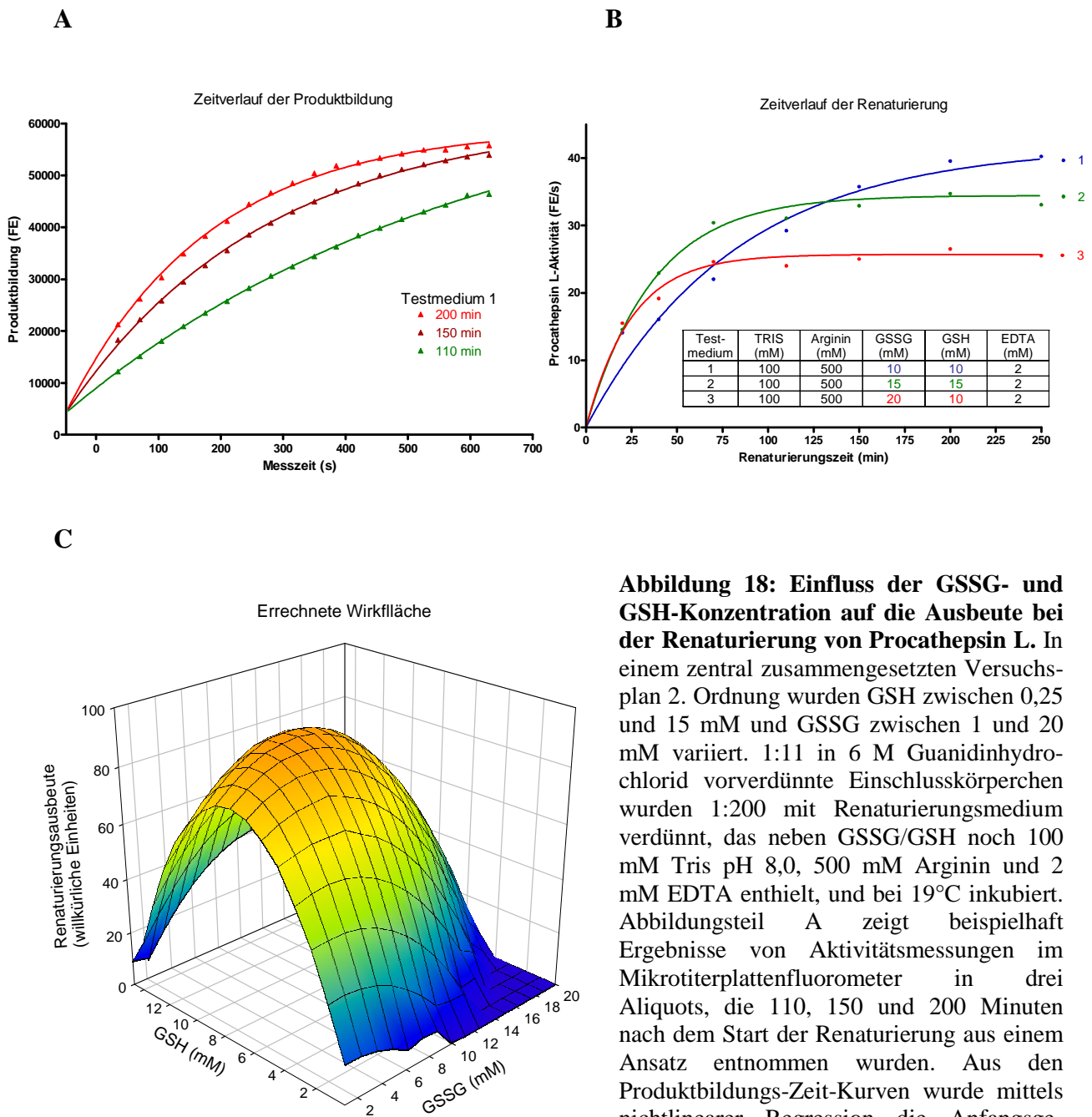
Denaturierte, fehlgefaltete Proteine und manche Faltungsintermediate exponieren hydrophobe Aminosäuren an der Moleküloberfläche und neigen infolge hydrophober Wechselwirkungen zur Aggregation. Das gilt es im Renaturierungsansatz zu verhindern. Detergenzien wie Brij, Chaps, Tween und Triton X-100 besetzen die hydrophoben Oberflächenareale, so dass es nicht zu einer Zusammenlagerung zwischen verschiedenen Protein-

molekülen kommen kann. Auch eine niedrige Proteinkonzentration und eine niedrige Temperatur verringern die Aggregationsneigung (Rudolph et al. 1997).

Es war nunmehr nötig diese große Anzahl von Einflussfaktoren umfassend zu untersuchen. Um im Experiment nicht nur die selektive Wirkung eines Faktors, sondern gegebenenfalls auch Wechselwirkungen erkennen zu können, mussten Versuchspläne entworfen werden, in denen sämtliche Einflussfaktoren in unterschiedlichen Konzentrationsstufen miteinander kombiniert werden. Wenn alle Konzentrationsstufen aller Faktoren miteinander kombiniert werden, spricht man von vollständigen Versuchsplänen. Ich habe häufig zentral zusammengesetzte Versuchspläne 2. Ordnung benutzt, denn da müssen zur Ermittlung der Konzentrationsoptima deutlich weniger Messungen durchgeführt werden. Deshalb wurden vollständige Versuchspläne nur bei unübersichtlichen Wechselwirkungen zwischen ausgewählten Faktoren benutzt, wenn beispielsweise im interessanten Konzentrationsbereich mehrere Optima vermutet wurden. Gelegentlich hatte es aber praktische Vorteile, beide Arten von Versuchsplänen zu kombinieren. Dann wurde ein Satz an Renaturierungsmedien hergestellt, der auf der Variation möglichst vieler Einflussfaktoren nach einem zentral zusammengesetzten Versuchsplan 2. Ordnung beruhte. Verschiedene Temperaturen, pH-Werte oder Enzymverdünnungen wurden dann mit dem kompletten Satz geprüft.

Literaturempfehlungen zufolge sollte die Renaturierung unter leicht alkalischen Bedingungen durchgeführt werden. Jedoch können pH-Werte von  $>9,5$  bereits zur Destabilisierung von lysosomalen Proteasen führen. Deshalb wurde für die ersten Versuche ein pH-Wert von 8,0 - 8,2 im Renaturierungsmedium eingestellt. Wie bereits erwähnt, sind die optimalen Konzentrationen des Redoxpuffers GSSG/GSH von grundlegender Bedeutung für den Renaturierungserfolg. Deshalb soll einleitend am Beispiel eines Vorversuchs zur Optimierung dieser beiden Faktoren der grundsätzliche experimentelle Ablauf von Renaturierungsversuchen geschildert werden (Abbildung 18). Nach einem zentral zusammengesetzten Versuchsplan 2. Ordnung, der zum Teil als Insert in Abbildungsteil 18 B eingefügt ist, wurden insgesamt 9 verschiedene Medien mit einem pH von 8,0 hergestellt, die sich durch die GSSG- und GSH-Konzentrationen unterschieden. Gestartet wurde durch 1:200 Verdünnung der solubilisierten Einschlusskörperchen mit Renaturierungsmedium und sofortigen Überführung in ein 19°C-Wasserbad. Um den Renaturierungserfolg beurteilen zu können, wurden während der Inkubation wiederholt Aliquots entnommen und bis zum Versuchsende in einer Mikrotiterplatte bei -80°C aufbewahrt. Alle Aliquots wurden am Ende gemeinsam bei pH 4,0 mit Pepsin prozessiert. Durch Zugabe von substrathaltigem Testmedium mit einem pH von 6,0 wurde die Prozessierung praktisch gestoppt und die Produktbildung durch kinetische

Messung mit dem Mikrotiterplattenfluorometer verfolgt. Abbildung 18 A zeigt, dass die Produktbildung nichtlinear erfolgt.



**Abbildung 18: Einfluss der GSSG- und GSH-Konzentration auf die Ausbeute bei der Renaturierung von Procathepsin L.** In einem zentral zusammengesetzten Versuchsplan 2. Ordnung wurden GSH zwischen 0,25 und 15 mM und GSSG zwischen 1 und 20 mM variiert. 1:11 in 6 M Guanidinhydrochlorid vorverdünnte Einschlusskörperchen wurden 1:200 mit Renaturierungsmedium verdünnt, das neben GSSG/GSH noch 100 mM Tris pH 8,0, 500 mM Arginin und 2 mM EDTA enthielt, und bei 19°C inkubiert. Abbildungsteil A zeigt beispielhaft Ergebnisse von Aktivitätsmessungen im Mikrotiterplattenfluorometer in drei Aliquots, die 110, 150 und 200 Minuten nach dem Start der Renaturierung aus einem Ansatz entnommen wurden. Aus den Produktbildungs-Zeit-Kurven wurde mittels nichtlinearer Regression die Anfangsgeschwindigkeit der Produktbildung berechnet, ein Maß für die Cathepsin L-Aktivität. Abbildungsteil B zeigt beispielhaft den Renaturierungsverlauf in 3 von insgesamt 9 Testmedien, deren Zusammensetzung im Insert angegeben ist. Unter Verwendung von Gleichung 6 wurde für jede der insgesamt 9 Kurven  $v_{\max}$  errechnet und den entsprechenden Konzentrationen an GSSG und GSH im Testmedium zugeordnet. Durch multiple Regression wurde aus diesem Datensatz eine dreidimensionale Wirkfläche berechnet (Abbildungsteil C).

Das liegt an der sehr hohen Enzymaktivität als Folge der hohen Renaturierungsausbeuten, die zum Verbrauch des eingesetzten Substrates innerhalb von 10 -



20 Minuten führen. Eine höhere Substratkonzentration hätte das Problem nicht gelöst, da dann der Messbereich des Gerätes begrenzend geworden wäre. Um lineare Produkt-Zeit-Kurven zu erhalten, hätte eine Zwischenverdünnung durchgeführt werden müssen. Da die Ermittlung der initialen Produktbildungsraten und damit der Konzentration an renaturiertem Enzym durch nichtlineare Regression leicht und zuverlässig möglich war, wurde darauf verzichtet.

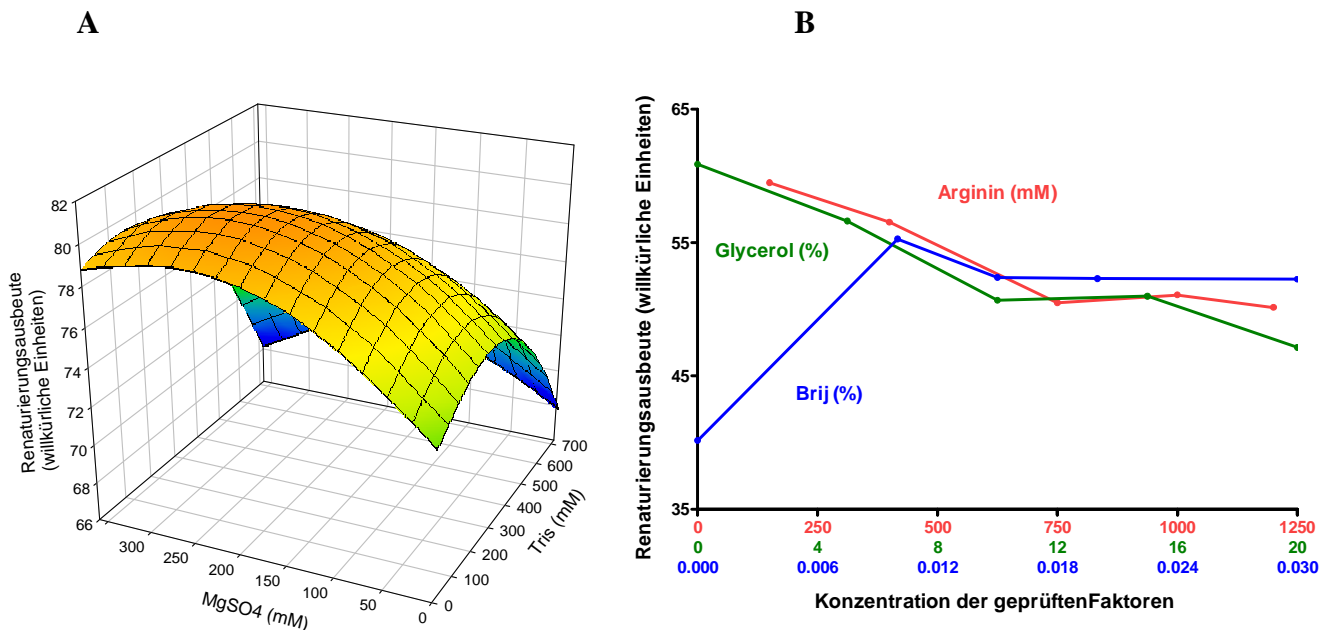
Die berechneten Cathepsin L-Aktivitäten sind in Abbildung 18 B als Funktion der Renaturierungszeit dargestellt. Man erkennt, dass die Enzymaktivitäten mit unterschiedlicher Geschwindigkeit unterschiedlichen Endwerten zustreben. Durch nichtlineare Regression unter Verwendung des Modells für eine Reaktion erster Ordnung (Gleichung 6) wurde der  $v_{\max}$  und die Halbwertszeit der Funktion bestimmt.  $v_{\max}$  entspricht der Renaturierungsausbeute im betreffenden Medium. Die Messung des Zeitverlaufs mit anschließender  $v_{\max}$ -Bestimmung ist weniger fehleranfällig als die einmalige Messung der Aktivität nach einer vorher festgelegten Renaturierungszeit. Wenn man die Ausbeute den Konzentrationen von GSSG und GSH im jeweiligen Renaturierungsmedium zuordnet, kann man durch multiple Regressionsanalyse eine dreidimensionale Fläche errechnen, die den Einfluss von GSSG und GSH in den gewählten Konzentrationsbereichen auf die Renaturierungsausbeute von Procathepsin L beschreibt (Abbildungsteil 18 C). Mit den durch multiple Regression ermittelten Parametern lassen sich die Konzentrationen an GSSG und GSH ermitteln, die im untersuchten Bereich zur höchsten Ausbeute führen.

Damit konnte bezüglich der optimalen Konzentrationen von GSSG und GSH im Renaturierungsmedium eine erste Aussage getroffen werden, sie liegen bei 7,4 mM GSSG und 8,35 mM GSH. In den folgenden Versuchen wurden diese beiden Konzentrationen konstant gehalten und der Einfluss weiterer Faktoren in Konzentrationsbereichen untersucht, die sich an den Optima, die in früheren Untersuchungen mit anderen Cathepsinen oder anderen Proteinen gefunden wurden, orientierten. Da nicht auszuschließen ist, dass einige der neu geprüften Faktoren die Wirkung des Redoxpuffers verändern, war von Anfang an geplant, nach Abschluss dieser Optimierungsversuche die in Abbildung 18 gezeigten Ergebnisse nochmals zu überprüfen.

Im ersten Versuch dieser Serie untersuchte ich unter Verwendung eines zentral zusammengesetzten Versuchsplans 2. Ordnung die Wirkungen und Wechselwirkungen von 5 Faktoren mit unterschiedlichen Wirkmechanismen: TRIS (0 - 800 mM), Arginin (0,15 – 1,2 M),  $\text{MgSO}_4$  (0 – 400 mM), Glycerol (0 – 20 %) und Brij (0 – 0,03 %). Jeder Faktor wurde in fünf Konzentrationsstufen geprüft. Dies ist typisch für zentral zusammengesetzte

Versuchspläne, da nur so auch nichtlineare Abhängigkeiten sicher erfasst werden können. Die Konzentrationen von GSSG (7,4 mM) und GSH (8,35 mM) blieben konstant, ebenso die Temperatur (19°C). Der pH-Wert wurde auf 8,2 eingestellt.

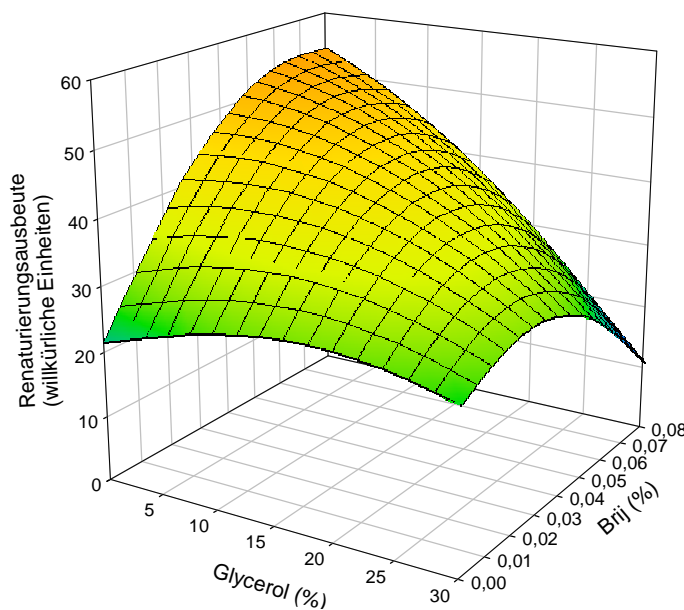
Abbildung 19 A zeigt ein Ergebnis des Versuchs in Form der Wirkfläche für die Abhängigkeit der maximalen Wiederfindung an aktivem Procathepsin L von der TRIS- und  $\text{MgSO}_4$ -Konzentration.



**Abbildung 19: Prüfung von fünf Faktoren auf die Renaturierungsausbeute von Procathepsin L.** In einem zentral zusammengesetzten Versuchsplan 2. Ordnung wurden folgende Faktoren geprüft: 0 - 800 mM TRIS, 0,15 – 1,2 M Arginin, 0 – 400 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0 - 20% Glycerol und 0 – 0,03 % Brij. In allen Renaturierungsmedien waren die Procathepsin L-Konzentration (1:2200 Gesamtverdünnung der solubilisierten Einschlusskörperchen), die Konzentration an EDTA (2mM), der pH-Wert (8,2) sowie die Konzentrationen der beiden Bestandteile des Redoxsystems aus GSSG (7,4 mM) und GSH (8,35 mM) identisch. Die Inkubation erfolgte bei 19°C über einen Zeitraum von 345 Minuten. Die Ermittlung der Renaturierungsausbeute erfolgte so, wie das in der Methodik beschrieben und durch Abbildung 18 illustriert ist. Abbildungsteil A zeigt die Wirkfläche für die Renaturierungsausbeute als Funktion der TRIS- und  $\text{MgSO}_4$ -Konzentration. Abbildungsteil B illustriert den Einfluss steigender Konzentrationen von Arginin, Glycerol und Brij auf die Renaturierungsausbeute. Dazu wurden die Renaturierungsausbeuten in all den Medien, die jeweils einen der drei Faktoren in der angegebenen Konzentration enthielten, gemittelt.

Das Optimum liegt bei einer TRIS-Konzentration von 192 mM und einer Magnesiumsulfat-Konzentration von 240 mM. Bezüglich des Konzentrationsoptimums des TRIS - Puffers ergaben sich auch in den Folgeversuchen keine widersprüchlichen Ergebnisse, so dass der Wert von 192 mM, der auch eine sehr gute Pufferung im relevanten pH-Bereich zwischen 7,5 und 8,5 garantiert, in die abschließende Liste (Tabelle 4) übernommen wurde.

Anders beim Magnesiumsulfat, wo der nachfolgende Vergleich mit Magnesiumchlorid einen deutlichen Vorteil für das Salz mit dem monovalenten Anion zeigte. Abbildung 19 B zeigt die Renaturierungsausbeute von Procathepsin L als Funktion der Konzentration der drei anderen, untersuchten Faktoren. Man erkennt, dass lediglich der Konzentrationsanstieg von Brij zu einer Steigerung der Renaturierungsausbeute führt. Da Glycerol und Brij sich durch ähnliche Wirkmechanismen möglicherweise gegenseitig beeinflussen, wurde im folgenden Versuch das Zusammenwirken beider Faktoren in einem größeren Konzentrationsbereich untersucht (Abbildung 20).

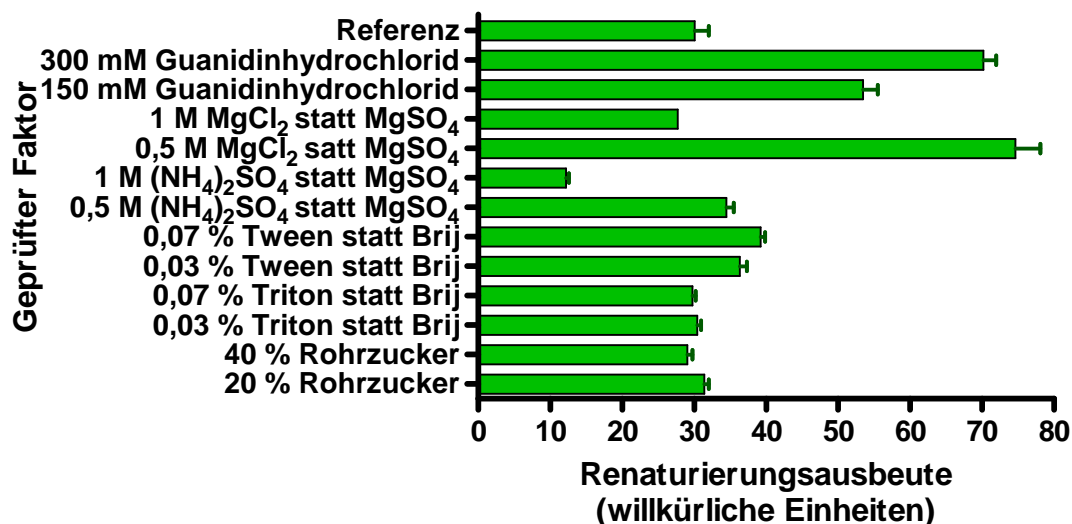


**Abbildung 20: Einfluss der Glycerol- und Brij-Konzentration auf die Renaturierungsausbeute von Procathepsin L.** In einem zentral zusammengesetzten Versuchsplan 2. Ordnung wurden Glycerol (0 – 30%) und Brij (0 – 0,08%). Die übrigen Versuchsbedingungen waren konstant und entsprachen denen in Abbildung 19. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 200 Minuten. In Abständen von 10 bis 20 Minuten wurden Aliquots zur Bestimmung der Renaturierungsausbeute entnommen.

Für Brij erkennt man eine nichtlineare Abhängigkeit mit einem Optimum am oberen Ende des untersuchten Konzentrationsbereichs. Es gibt starke negative Wechselwirkungen mit Glycerol, die maximale Renaturierungsausbeute wird bei einer Brij-Konzentration von 0,07% und ohne Glycerol erreicht. Brij ist ein nichtionisches Detergenz. Um zu überprüfen, ob das Vorhandensein anionischer oder kationischer Ladungen an einem Detergenz noch zu einer Steigerung des positiven Effektes führt, sollte ein zwitterionisches Detergenz im direkten Vergleich mit Brij untersucht werden. Dazu wurden in zwei ansonsten identischen Versuchsreihen der Zusatz von Brij und Chaps (jeweils 0 – 0,08%) verglichen (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Wirkprofile vom Chaps und Brij ähneln sich, mit beiden Detergenzien wurde ein Konzentrationsoptimum von etwa 0,07% gefunden. Die maximale Renaturierungsausbeute war jedoch mit Chaps geringer. Anionische und kationische Ladungen wirken sich

folglich nicht förderlich aus, ionische Detergenzien wurden deshalb nicht weiter untersucht und für die weiteren Renaturierungen wurde eine Brij-Konzentration von 0,07 % festgelegt.

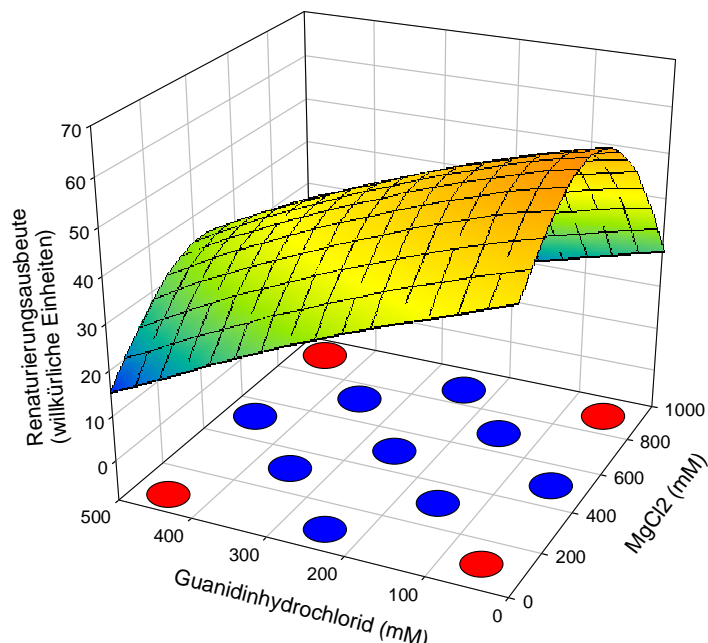
Da nun schon wichtige Renaturierungsparameter unter Berücksichtigung möglicher Wechselwirkungen optimiert worden waren, wodurch Ausbeuten von mehr als 30% erreicht wurden, war es jetzt zur Reduzierung des experimentellen Aufwands auch möglich, den Einfluss weiterer Faktoren, von denen keine Wechselwirkungen zu erwarten waren, mit einem einfachen faktoriellen Versuchsplan systematisch zu prüfen. Jeder Faktor wurde in zwei Konzentrationen, die sich etwa um den Faktor 2 unterschieden, im Vergleich zu einer Kontrolle geprüft, deren Zusammensetzung sich aus den bisherigen Versuchen ergab: 192 mM Tris, 240 mM Magnesiumsulfat, 7,4 mM GSSG, 8,35 mM GSH, 0,07 % Brij, 2 mM EDTA. Die beiden nichtionischen Detergenzien Triton und Tween 20 wurden als Alternative zu Brij eingesetzt, das als nicht-ionisches Detergenz besser als das zwitterionische Chaps war. Beide wurden statt Brij dem Renaturierungsmedium zugesetzt. Mit Magnesiumchlorid und Ammoniumsulfat sollten die Ionen des bisher erfolgreich verwendeten Magnesiumsulfats getrennt untersucht werden. Aus diesem Grund wurde in diesen Medien Magnesiumsulfat weggelassen. Guanidinhydrochlorid wirkt im Konzentrationsbereich <300 mM schwach destabilisierend, Saccharose soll die Oberflächenspannung des wässrigen Mediums erhöhen und so die native Struktur des Proteins stabilisieren.



**Abbildung 21: Einfacher faktorieller Versuch zur Prüfung des Einflusses von sechs Zusätzen in jeweils zwei Stufen auf den Renaturierungserfolg von Procathepsin L.** Das Referenzmedium bestand aus 192 mM Tris, 240 mM MgSO<sub>4</sub>, 7,4 mM GSSG, 8,35 mM GSH, 0,07% Brij, 2 mM EDTA, pH 8,0. Bei jedem der geprüften Zusätze ist neben der Endkonzentration im Renaturierungsmedium angegeben, ob es zusätzlich oder als Ersatz verwendet wurde. Die übrigen Versuchsbedingungen entsprachen denen in Abbildung 19. Die Berechnung der Renaturierungsausbeute erfolgte auf der Grundlage von Aktivitätsmessungen in je 15 während des Versuchs entnommenen Aliquots.

Die insgesamt 13 Ansätze wurden nach Zugabe des denaturierten Procathepsin L 200 Minuten lang bei 19°C inkubiert. Abbildung 21 zeigt das Ergebnis. Durch Vergleich der jeweils erreichten Renaturierungsausbeute mit der im Referenzmedium kann auf einen positiven, negativen oder indifferenten Einfluss des entsprechenden Zusatzes geschlossen werden. Der Zusatz von Saccharose, Triton und Tween 20 hatte im geprüften Konzentrationsbereich keinen Effekt, d.h. die Renaturierungsausbeute entsprach etwa der Referenz. Ammoniumsulfat scheint vor allem in höherer Konzentration die Renaturierung zu stören. Durch 0,5 M Magnesiumchlorid und 0,3 M Guanidinhydrochlorid wurde die Renaturierungsausbeute etwa verdoppelt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass 1 M Magnesiumchlorid zu einer erheblichen Verlängerung der Halbwertszeit der Renaturierung führte, so dass die Beobachtungszeit zu kurz war und die maximale Renaturierungsausbeute nicht exakt ermittelt werden konnte. Dies wurde im folgenden Versuch durch eine Verlängerung der Beobachtungszeit auf 20 Stunden berücksichtigt. Der in Abbildung 22 dargestellte Versuch hatte das Ziel, die Konzentrationsoptima und Wechselwirkungen für Magnesiumchlorid und Guanidinhydrochlorid zwischen 0 und 1 M bzw. 0 und 0,5 M zu ermitteln.

**Abbildung 22: Wechselwirkung zwischen Magnesiumchlorid- und Guanidinhydrochlorid- Konzentration auf die Renaturierungsausbeute von Procathepsin L.** Nach einem erweiterten zentral zusammengesetzten Versuchsplan 2. Ordnung wurden 0 – 1 M  $\text{MgCl}_2$  mit 0 – 500 mM Guanidinhydrochlorid kombiniert. In der X-Y-Ebene sind die Messpunkte des zentral zusammengesetzten Versuchsplans (blaue Punkte) sowie die zusätzlich untersuchten Eckpunkte aus dem entsprechenden vollständigen Versuchsplan (rote Punkte) markiert. Die Vorteile dieses modifizierten Versuchsplans sind im Text erwähnt. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 20 Stunden, das Renaturierungsmedium enthielt 192 mM Tris pH 8,0, 7,4 mM GSSG, 8,35 mM GSH, 0,07% Brij und 2 mM EDTA, alle übrigen Bedingungen und die Berechnung der Renaturierungsausbeute sind in der Legende zu Abbildung 21 beschrieben.

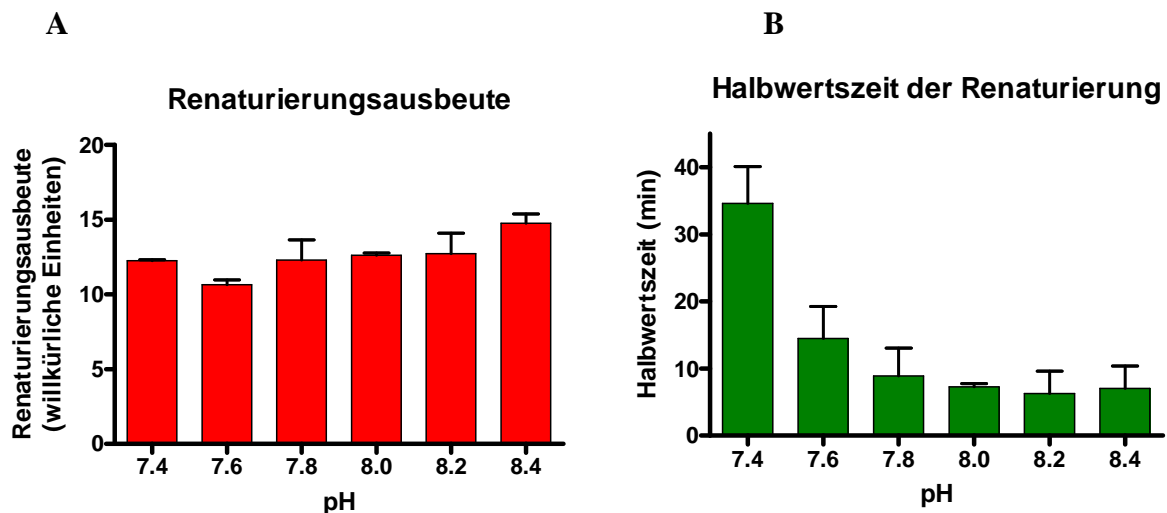


Bei der Versuchsplanung wurden negative Erfahrungen bei der Auswertung von Experimenten nach einem zentral zusammengesetzten Versuchsplan 2. Ordnung berücksichtigt. Ich hatte nämlich gelegentlich feststellen müssen, dass keine plausiblen Optima berechnet werden konnten, wenn die höchsten Messwerte auf zwei benachbarte Sternpunkte fielen. In diesen Fällen musste dann der ganze Versuch mit veränderten Konzentrationsbereichsgrenzen wiederholt werden. Dies könnte vermieden werden, wenn, wie im folgenden Versuch, zusätzlich zu den Sternpunkten noch die Eckpunkte des entsprechenden vollständigen Versuchsplans mit gemessen und ausgewertet würden (Details in der Methodik). Die farbig markierten Felder der X-Y-Ebene von Abbildung 22 symbolisieren die Lage der Messpunkte nach einem solchen kombinierten Versuchsplan. Die blauen Felder entsprechen den Punkten des zentral zusammengesetzten Versuchsplan, die roten den zusätzlich gemessenen Eckpunkten. Bis auf den Magnesiumsulfatzusatz entsprach die Medienzusammensetzung der Referenz des vorangegangenen Versuchs.

Es zeigt sich ein eindeutiges Optimum bei 400 mM Magnesiumchlorid und ohne Guanidinhydrochlorid. Die an diesem Punkt erreichte Ausbeute ist mit der im Vorversuch nach Zusatz von 500 mM Magnesiumchlorid vergleichbar, also etwa doppelt so hoch wie der Vergleichswert mit Magnesiumsulfat. Daher kann Magnesiumsulfat im Renaturierungsansatz durch Magnesiumchlorid in der optimalen Konzentration von 400 mM ersetzt werden. Guanidinhydrochlorid zeigte mit Magnesiumchlorid negative Wechselwirkungen und wurde daher nicht weiter untersucht.

Die eben beschriebenen Veränderungen der Renaturierungsbedingungen steigerten die Renaturierungsausbeute auf ca. 75%. Das ist, auch im Vergleich zu publizierten Daten, ein gutes Ergebnis (D'Alessio et al. 1999: 52,6% bei Procathepsin K; Tobbell et al. 2002: 35,6% beim Procathepsin S). Trotzdem habe ich noch geprüft, ob das anfänglich gewählte Redoxpuffersystem (7,4 mM GSSG, 8,35 mM GSH bei pH 8,2) auch in Kombination mit den neuen Faktoren noch optimale Ergebnisse liefert. Der Schwerpunkt dieser Nachuntersuchung lag auf der Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes, die bisher noch nicht systematisch erfolgt war. In den beiden ersten Experimenten dieser Serie kombinierte ich die pH-Werte 8,0, 8,2 und 8,4 mit je einem vollständigen und einem zentral zusammengesetzten Versuchsplan 2. Ordnung zur Prüfung unterschiedlicher Redoxpufferkonzentrationen (0 – 20 mM GSSG sowie 4 – 30 mM GSH). Die Renaturierungsausbeuten bei den drei pH-Werten waren etwa gleich, zwischen den unterschiedlichen GSSG- und GSH-Konzentrationen bestanden nur geringe, scheinbar zufällige Unterschiede. Derartige Schwankungen könnten allein durch Messungenauigkeiten zustande kommen. Der Versuch, vom Rechner Wirkflächen bestimmen

zu lassen, bestätigte diesen Verdacht - für die beiden prinzipiell gleichen Versuche ergaben sich ganz verschiedene Maxima und Minima, die auf kleinsten Unterschieden in den Ausbeuten basierten. Dies zeigt deutlich, dass in diesem Grundmedium die Variation von GSSG und GSH im gewählten Konzentrationsbereich keinen Einfluss auf den Renaturierungserfolg hat. Für die folgenden Renaturierungen wurden dann aus zwei praktischen Gründen 7,4 mM GSSG und 8,35 mM GSH eingesetzt, einmal um die formale Vergleichbarkeit mit früheren Ergebnissen zu erhalten und darüber hinaus, um durch den vergleichsweise niedrigen Materialeinsatz bei den geplanten präparativen Renaturierungen Reagenzkosten zu sparen. Um Aussagen zum Einfluss des pH auf die Renaturierungsausbeute machen zu können, war im eben beschriebenen Doppelerperiment das untersuchte Intervall nicht groß genug. Deshalb wurde im folgenden Versuch der pH-Einfluss in einem größeren Bereich untersucht. Sechs, in ihrer übrigen Zusammensetzung identische Renaturierungsmedien wurden auf die pH-Werte 7,4, 7,6, 7,8, 8,0, 8,2 und 8,4 eingestellt und jeweils mit der gleichen Menge an denaturiertem Proenzym versetzt. Abbildung 23 zeigt den Einfluss des pH auf die finale Renaturierungsausbeute (A) und die Renaturierungsgeschwindigkeit (B):



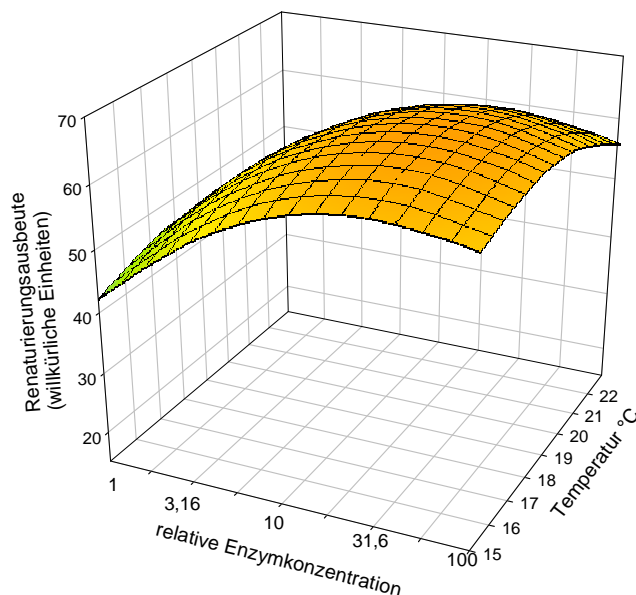
**Abbildung 23: Einfluss des pH-Werts auf Ausbeute und Halbwertszeit der Renaturierung von Procathepsin L.** In 6 Medien wurden pH 7,4, 7,6, 7,8, 8,0, 8,2 und 8,4 eingestellt. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 120 Minuten, das Renaturierungsmedium enthielt 192 mM Tris pH 8,0, 400 mM MgCl<sub>2</sub>, 7,4 mM GSSG, 8,35 mM GSH, 0,07% Brij und 2 mM EDTA, alle übrigen Bedingungen und die Berechnung der Renaturierungsausbeute sind in der Legende zu Abbildung 21 beschrieben. Die Enzymverdünnung betrug 1:3000, bezogen auf die solubilisierten Einschlusskörperchen.

Man erkennt, dass die maximale Renaturierungsausbeute von Procathepsin L unter den gewählten Bedingungen im pH- Bereich von 7,4 bis 8,4 im Rahmen der Fehlerbreite etwa konstant ist. Anders verhält es sich mit der HWZ, die sich mit sinkendem pH-Wert des



Renaturierungsmediums erheblich verlängert, aber zwischen pH 8,0 und 8,4 ihr Minimum erreicht. Diese Ergebnisse bestätigen die bereits im vorangegangenen Versuch gemachte Beobachtung, dass eine Variation des pH-Wertes zwischen 8,0 und 8,4 für den Verlauf der Renaturierung unerheblich ist. Der bisher und auch künftig genutzte pH von 8,2 (Tabelle 4) liegt in der Mitte dieses Intervalls. Das hat den Vorteil, dass zufällige Schwankungen mit Sicherheit bedeutungslos bleiben.

Temperatur und Enzymverdünnung haben den entscheidenden Einfluss auf die Kollisionswahrscheinlichkeit der Proteinmoleküle im Renaturierungsansatz und damit auf die (unerwünschte) Bildung von Proteinaggregaten, was im ungünstigsten Fall die Renaturierungsausbeute erheblich verschlechtern kann (Betton und Chaffotte 2005, Kiefhaber et al. 1991). Eine Temperatur von 19°C hatte sich in Vorversuchen als günstig erwiesen. Sie wurde deshalb in das Zentrum des untersuchten Temperaturintervalls (15 – 23°C) gelegt. Es wurden Enzymverdünnungen von 1:10000 bis 1:100 geprüft (Abbildung 24). Die Grenzen ergaben sich aus praktischen Überlegungen: die Bestandteile des Denaturierungsmediums sollten mindestens auf 1:100 der wirksamen Konzentrationen verdünnt werden, eine 1:10000 Verdünnung lag etwas oberhalb der Nachweisgrenze des enzymatischen Tests für Cathepsin L. Für TRIS, MgCl<sub>2</sub>, GSSG, GSH, EDTA und den pH wurden die bisher optimierten Werte verwendet.



**Abbildung 24: Einfluss von Temperatur und Enzymverdünnung auf die Renaturierungsausbeute von Procathepsin L.** In einem zentral zusammengesetzten Versuchsplan 2. Ordnung wurden fünf verschiedene Temperaturen (15°C, 17°C, 19°C, 21°C und 23°C) sowie fünf Verdünnungsstufen der solubilisierten Einschlusskörperchen, die als relative Enzymkonzentrationen (in Klammern) angegeben sind, (1:10000 (= 1), 1:3160 (= 3,16), 1:1000 (= 10), 1:360 (= 31,6) und 1:100 (= 100)) untersucht. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 20 Stunden, nach etwa 200 Minuten war die maximale Ausbeute erreicht. Messung und Prozessierung der Aliquots erfolgten nach Nachverdünnung mit Renaturierungsmedium bei einer Gesamtverdünnung von 1:3160, mit Ausnahme der Aliquots, in denen das Enzym bereits 1:10000 verdünnt vorlag. Die in den 1:10000 verdünnten Aliquots gemessenen Aktivitäten wurden zum Vergleich mit den anderen mit 3,16 multipliziert.

folgten nach Nachverdünnung mit Renaturierungsmedium bei einer Gesamtverdünnung von 1:3160, mit Ausnahme der Aliquots, in denen das Enzym bereits 1:10000 verdünnt vorlag. Die in den 1:10000 verdünnten Aliquots gemessenen Aktivitäten wurden zum Vergleich mit den anderen mit 3,16 multipliziert.



Die Wirkfläche zeigt, dass bei Verdünnungen des Enzyms zwischen 1:100 und 1:10000, immer bezogen auf solubilisierten Einschlusskörperchen, die Temperatur nur einen sehr geringen Einfluss auf die Renaturierungsausbeute hat. Das Optimum liegt, wie in den Vorversuchen, bei 19°C. Der Einfluss der Enzymkonzentration ist stärker, bei Verdünnungen >100 kommt es zu einem Abfall der Renaturierungsausbeute. Das Optimum der Enzymverdünnung im Renaturierungsmedium liegt bei 1:781. Für die Renaturierung großer Enzymmengen wurde in späteren Versuchen aus praktischen Gründen dennoch eine Enzymverdünnung von 1:100 gewählt: So war das Volumen des Renaturierungsmediums kleiner, was eine bessere Hantierbarkeit in den Folgeschritten gewährleistete und der Verbrauch an Reagenzien begrenzte. Diese Vorteile überwogen die möglicherweise geringfügige Verminderung der Renaturierungsausbeute bei weitem, zumal wir im direkten Vergleich zwischen der 1:781 und der 1:100 Verdünnung in einem semipräparativen Zusatzversuch keine signifikanten Unterschiede finden konnten.

Mit der erfolgreichen Untersuchung der beiden Faktoren Temperatur und Enzymverdünnung konnten die Versuche zur Optimierung der Renaturierungsbedingungen des Procathepsin L abgeschlossen werden. Tabelle 4 gibt eine Übersicht über alle untersuchten Faktoren, den untersuchten Bereich und die entscheidenden Ergebnisse.

**Tabelle 4: Zusammenfassende Darstellung der untersuchten Einflussfaktoren auf die Renaturierung von Procathepsin L.**

Faktor	Untersuchter Bereich	Einfluss	Ermitteltes Optimum
TRIS	0 – 1 M	Positiv	192 mM
Arginin	0 – 1,2 M	Negativ	-
Magnesiumsulfat	0 – 1 M	Positiv aber schlechter als $\text{MgCl}_2$	-
Magnesiumchlorid	0 – 1 M	Stark positiv	400 mM
Ammoniumsulfat	0 – 1 M	Negativ	-
GSSG	0 – 20 mM	Schwach positiv	7,4 mM
GSH	0,25 – 30 mM	Schwach positiv	8,35 mM
Glycerol	0 – 36%	Negativ	-
Brij	0 – 0,08%	Positiv	0,07%
Chaps	0 – 0,08%	Positiv aber schlechter als Brij	-
Saccharose	0 – 40%	Kein	-
Tween 20	0 – 0,07%	Kein	-
Triton X-100	0 – 0,07%	Kein	-
Guanidinhydrochlorid	0 – 500 mM	Zusammen mit $\text{MgCl}_2$ negativ	-
pH	7,8 – 8,4	Schwach	8,2
Temperatur	10 – 23°C	Schwach	19°C
Enzymkonzentration	0,4 µg/ml bis 40 µg/ml	Schwach	5,12 µg/ml (nicht besser als 40µg/ml)

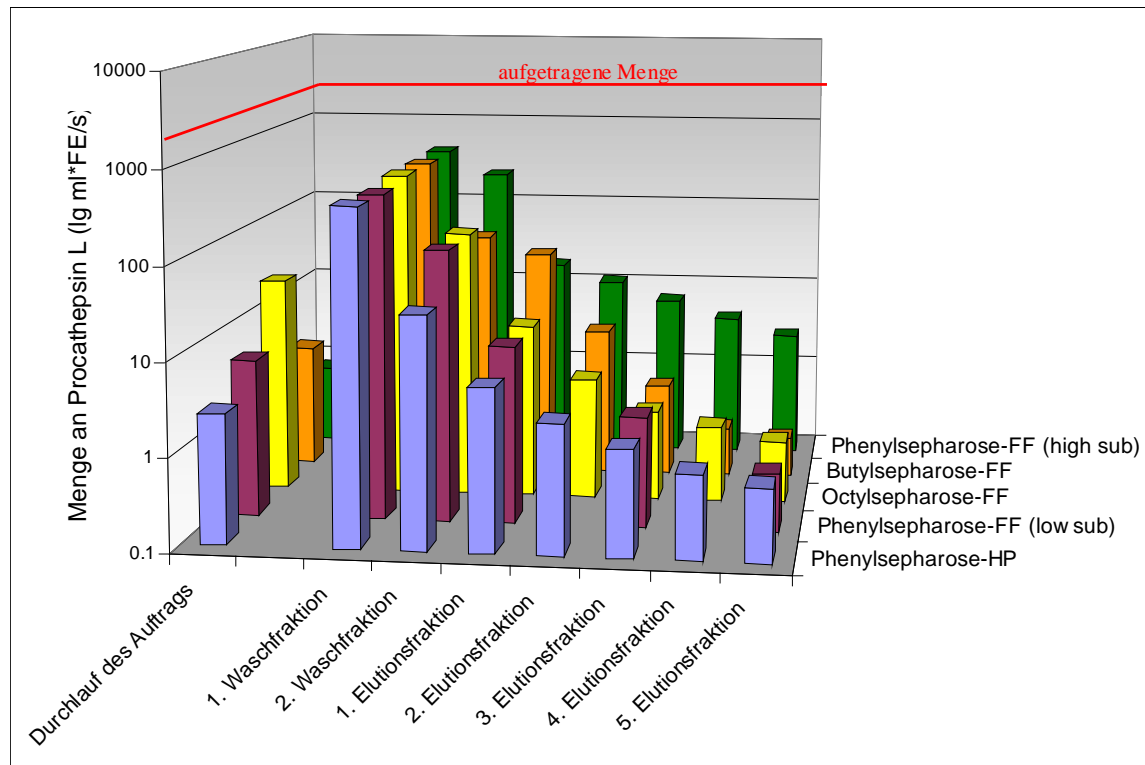
#### 5.4 Reinigung von renaturiertem Procathepsin L durch hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Prinzipiell können Reinigungsschritte an jeder Stelle einer Enzympräparation eingefügt werden, falls sich das als notwendig oder vorteilhaft herausstellt. Falls beispielsweise Fremdproteine den Ablauf der Renaturierung stören würden, wäre ein vorgelagerter Reinigungsschritt, z.B. eine Gelchromatographie unumgänglich (Kopitar et al.

1996). Letztlich kommt es darauf an, dass das Endprodukt den Qualitätsvorgaben entspricht, die sich aus seiner geplanten Verwendung ergeben, also eine möglichst hohe Reinheit und einen hohen Anteil an aktivem Enzym besitzt. Unter Berücksichtigung der Reinheit entsprechender kommerzieller Präparate und der eigenen Erfahrungen mit Cathepsin S ergab sich ein Zielwert >90% Reinheit. Die Reinheit der Einschlusskörperchen betrug nur 65%, der Renaturierungsschritt verbesserte diesen Wert nicht, er führte aber durch die 1:100 Verdünnung der aus den Einschlusskörperchen gelösten Proteine zu einem neuen Problem: Volumina, die sich nachfolgend nicht mehr hantieren ließen. Auch deshalb musste nach der Renaturierung ein chromatographischer Reinigungsschritt angeschlossen werden, der neben dem theoretisch zu erwartenden Zuwachs an Reinheit noch die praktischen Vorteile Volumenreduktion und Entfernung der Renaturierungszusätze bringen sollte. Dazu sind prinzipiell drei zur Konzentrierung und Vorreinigung empfohlene Chromatographieverfahren nutzbar: hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC), Ionenaustauschchromatographie und Affinitätschromatographie. Das Prinzip der Bindung von Proteinen an HIC-Trennmedien basiert auf Interaktionen zwischen den hydrophoben Liganden von Gelpartikeln und dem Protein. Solche hydrophoben Wechselwirkungen werden durch eine hohe Ionenstärke verbessert und durch Detergenzien aufgehoben. Das Renaturierungsmedium weist bereits eine relativ hohe Salzkonzentration (400 mM  $\text{MgCl}_2$ ) und eine nur geringe Konzentration an Detergenzien (0,07% Brij) auf. Das war einer der Gründe zur Wahl einer HIC-Reinigung, denn es war zu erwarten, dass die hohe  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration die Bindung von Procathepsin L an einen Ionenaustauscher gestört hätte. Für die zweite Alternative, die Durchführung einer Affinitätschromatographie stand mir kein Trenngel mit einem spezifischen Liganden zur Verfügung. Damit war schon aus praktischen Gründen die Entscheidung für die HIC gut begründet. Hinzu kam, dass aus Versuchen in der eigenen Arbeitsgruppe mit Cathepsin S (Kramer in Vorbereitung) bekannt war, dass sich die HIC gut zur Trennung der Proformen vom reifen Enzym eignet.

Mir stand ein Satz von fünf HIC-Probesäulen mit verschiedenen Trennmedien zur Verfügung: Butylsepharose-FF, Phenylsepharose-FF mit hoher oder niedriger Ligandendichte (high bzw. low substituted), Octylsepharose-FF und Phenylsepharose-HP. In einem Vorversuch prüfte ich die Bindungseigenschaften dieser Medien für Procathepsin L aus dem Renaturierungsansatz, dem ich noch 1 M Ammoniumsulfat zugesetzt hatte. Anschließend wurden Elutionsverhalten und Reinigungseffekt verglichen, da arbeitete ich erst einmal die beim Procathepsin S bewährten Bedingungen nach: Waschung mit Puffer sehr geringer Ionenstärke und Elution durch einen ansteigenden Ethylenglycol-Gradienten. Jede Minisäule

wurde in genau der gleichen Weise behandelt: die Durchläufe beim Auftrag der Probe, beim Waschen und bei der Elution wurden fraktioniert gesammelt, anschließend in Aliquots prozessiert und gemessen. Abbildung 25 zeigt das Ergebnis, die logarithmische Darstellung macht die Unterschiede zwischen den Trennmedien deutlicher.



**Abbildung 25: Prüfung von fünf HIC-Trenngelen zur Reinigung von Procathepsin L.** Es wurde ein Satz Minisäulen, gefüllt mit je 1 ml der an der rechten Abszisse angegebenen HIC-Trenngelen, verwendet. Zur initialen Konditionierung (2 M Ammoniumsulfat / 50 mM TRIS pH 8,0) und finalen Regenerierung (20% Propanol) wurden die Säulen in Serie miteinander verbunden, die Prüfung der Trenneigenschaften erfolgte individuell in jeweils genau der gleichen Weise bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Aufgetragen wurden je 10 ml renaturisiertes Procathepsin L, dem zuvor durch Vermischen mit einer 4 M Ammoniumsulfatstammlösung 1 M Ammoniumsulfat zugesetzt wurde. Das Waschen erfolgte mit 50 mM TRIS pH 8,0, die Elution mit einem innerhalb von 20 Minuten auf 70% ansteigenden Ethylenglykol-Gradienten im Waschpuffer, der im Anschluss noch 10 Minuten lang gehalten wurde. Dargestellt sind die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung in Aliquots aus den fraktionierten Säuleneluatens multipliziert mit den Volumina der entsprechenden Fraktionen. Lediglich fünf von 17 Fraktionen, die bei der Elution gesammelt wurden, sind dargestellt, da in den nachfolgenden kaum noch Aktivität nachweisbar war. Die rote Linie symbolisiert die aufgetragene Menge.

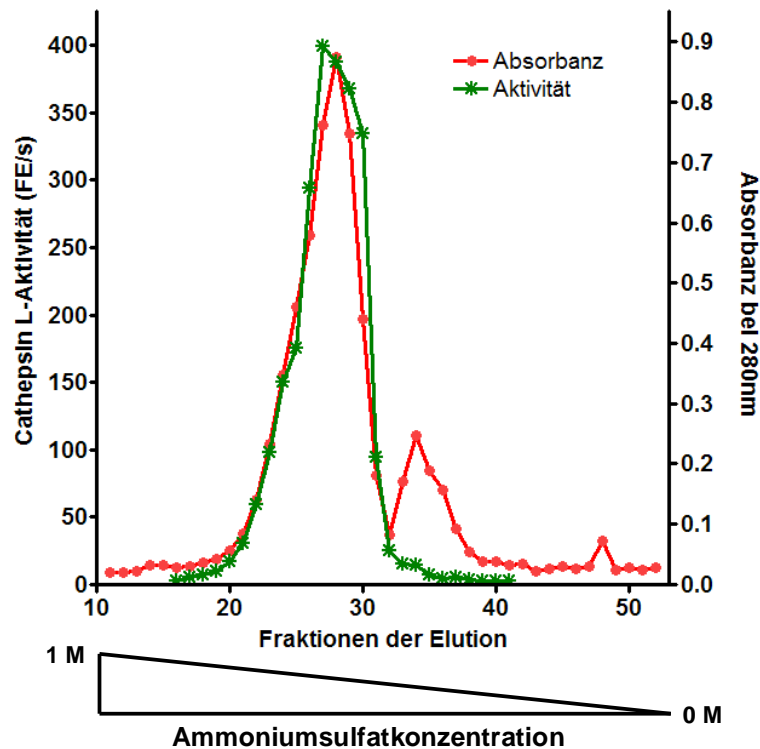
Die Aktivitäten im Durchlauf beim Auftrag waren sehr gering, was für eine hohe Bindung an das Säulenmaterial spricht. Erwartungsgemäß waren die Verluste mit der Phenylsepharose-FF (high substituted) am geringsten, etwa 1 Größenordnung schlechter war Butylsepharose-FF, vermutlich wegen der geringsten Hydrophobizität aller fünf untersuchten Liganden. Die Waschung mit 50 mM TRIS pH 8,0 führte bei allen Trennmedien zur Elution

des größten Teils des gebundenen Procathepsin L, wobei die 1. Fraktion erwartungsgemäß dominiert, der nachfolgende Ethylenglykol-Gradient setzt nur noch Restmengen frei. Grundsätzlich ist also festzustellen, dass die Hydrophobizität von Procathepsin L wesentlich geringer ist als die von Procathepsin S, das durch 50 mM TRIS nicht eluiert wurde. Die entscheidende Schlussfolgerung aus diesem Experiment ist deshalb, dass mit einem Medium höherer Ionenstärke gewaschen und mit einem Gradienten mit fallender Ionenstärke eluiert werden muss. Darüber hinaus ist festzustellen, dass sich bei der Phenylsepharose-HP-Minisäule, verglichen mit den anderen Trennmedien, der größte Anteil an eluiertem Enzym in der 1. Waschfraktion befindet. Dies entspricht einem schmalbasigen Peak und sollte deshalb bei zukünftigen Reinigungen mit diesem Medium zu einem vorteilhaften Elutionsverhalten führen. Eher zufällig war die Beobachtung, dass sich am Ende dieses Experiments Präzipitate im übrig gebliebenen Säulenauftragsmaterial ausbildeten, die sich beim Abkühlen noch verstärkten. Um zu prüfen, ob es durch die hohe Konzentration an Ammoniumsulfat auch zur Ausfällung von Procathepsin L kommt, habe ich ein Aliquot zentrifugiert und anschließend Sediment und Überstand elektrophoretisch untersucht. Es zeigte sich, dass Procathepsin L im Sediment enthalten ist, also in Gegenwart von 1 M Ammoniumsulfat langsam präzipitiert. Vor den Folgeversuchen erfolgte dann durch systematisches Probieren die Bestimmung der Ammoniumsulfatkonzentration, die zur vollständigen Bindung noch ausreichend ist, aber noch nicht zur Präzipitation führt. Darauf wird später ausführlicher eingegangen.

Zuvor wurde aber noch der bereits geplante präparative Pilotversuch mit einer Phenylsepharose-HP-Säule unter Verwendung des noch reichlich vorhandenen ungereinigten Procathepsin L / 1 M Ammoniumsulfat, das durch Zentrifugation von den Präzipitaten befreit und anschließend nur noch bei Raumtemperatur hantiert wurde, durchgeführt. Waschung und Elution unterschieden sich vom Vorversuch mit den Minisäulen: wie erwartet waren die Procathepsin L-Mengen in den Waschfraktionen mit 1 M Ammoniumsulfat sehr gering. Die Elution erfolgte mit fallendem Gradienten von 0,5 auf 0 M Ammoniumsulfat in 50 mM TRIS pH 8,0 über 60 min. Es zeigte sich ein steiler, schmaler Gipfel an Procathepsin L, dessen aktivste Fraktionen von vergleichbarer elektrophoretischer und spektroskopischer Reinheit waren (nicht dargestellt). Das bewies die prinzipielle Eignung der Methode, insbesondere des sehr einfachen Elutionsverfahrens.

Wie schon angekündigt, mussten nun noch die Bindungsbedingungen so optimiert werden, dass keine Enzymverluste durch Präzipitation auftreten. Dazu wurde ein Aliquot an Procathepsin L-haltigen Renaturierungsmedium mit 250 mM Ammoniumsulfat versetzt, dabei wurden keine Präzipitationen beobachtet. Nach Konditionierung der Phenylsepharose-

HP-Säule mit Grundmedium mit der gleichen Ammoniumsulfatkonzentration wurde die Probe aufgetragen. Gewaschen wurde ebenfalls mit 250 mM Ammoniumsulfat. Die Bestimmung der Aktivitäten in den fraktionierten Durchläufen zeigte, dass diese niedrige Salzkonzentration nicht ausreichend war. Fast 90% des Enzyms war nicht gebunden worden. Deshalb wurde die Ammoniumsulfatkonzentration im Auftrag auf 500 mM erhöht und die Säule mit 1 M Ammoniumsulfat konditioniert. Gewaschen wurde mit 500 mM Ammoniumsulfat, die Elution erfolgte mit fallendem Gradienten von 500 auf 0 mM Ammoniumsulfat in 60 min. Während des Auftrags wurde der Säulendurchlauf in 4 Fraktionen gesammelt. In der ersten Fraktion war kaum messbare Aktivität von Procathepsin L vorhanden. In der zweiten bis vierten Fraktion wurden gleiche Enzymaktivitäten wie im Auftragsmaterial gemessen, so dass von einer Sättigung der Bindungsfähigkeit der Säule nach einem Viertel des Auftrags ausgegangen werden konnte. Das gebundene Proenzym konnte in einem breitbasigen Peak eluiert werden (nicht dargestellt). Eine weitere Erhöhung der Salzkonzentration zur Steigerung der hydrophoben Interaktionen und damit zur Erhöhung der Bindungskapazität war also für eine effektive Reinigung unumgänglich. Die Fraktionen 2 bis 4 des Durchlaufs des Auftrags vom Vorversuch wurden deshalb vereinigt und die Ammoniumsulfatkonzentration auf 750 mM erhöht. Konditionierung und Waschung mit 1 M Ammoniumsulfat hatten sich bewährt und wurden beibehalten. Diesmal gelang das Vorhaben: Es entstanden während der gesamten Versuchszeit keine Präzipitate und im Durchlauf des Auftrags waren keine Aktivitäten messbar. Eluiert wurde mit einem fallenden Ammoniumsulfatgradienten (1 M auf 0 M). Es wurden 52 Fraktionen gesammelt, in denen nach Prozessierung die Cathepsin L-Aktivität und die Absorbanz bei 280 nm als Maß für den Proteingehalt gemessen wurden (Abbildung 26). In den Fraktionen mit hoher Proteinkonzentration finden sich die höchsten Enzymaktivitäten, die abgetrennten Fremdproteine haben eine höhere Hydrophobizität als Procathepsin L.



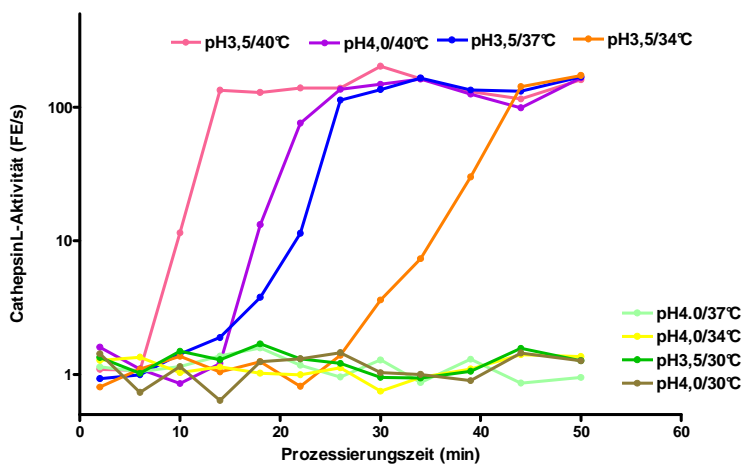
**Abbildung 26: Elutionsprofil der Peakfraktionen bei der Procathepsin L-Reinigung mittels HIC-Phenylsepharose-HP-Säule.** Nach Konditionierung der HiLoad 16/10 Phenylsepharose-HP-Säule mit 1 M Ammoniumsulfat wurde renaturiertes Procathepsin L in Gegenwart von 750 mM Ammoniumsulfat aufgetragen. Zur Elution wurde ein fallender Gradient von 1 M Ammoniumsulfat in 50 mM TRIS pH 8,0 verwendet, der schematisch im unteren Teil der Abbildung dargestellt ist. Die  $A_{280}$ -Messung aller Fraktionen erfolgte in 1 cm-Küvetten gegen einen Leerwert, die Aktivitätsmessung in prozessierten Aliquots, wie in der Methodik beschrieben.

Es ergab sich also das folgende optimierte Reinigungsprotokoll: nach Konditionierung der Phenylsepharose-HP-Säule mit 1 M Ammoniumsulfat erreicht man eine vollständige Bindung von renaturiertem Procathepsin L in Gegenwart von 750 mM Ammoniumsulfat ohne dass es zu Präzipitationen kommt. Zur Elution eignet sich ein fallender Gradient von 1 M Ammoniumsulfat in 50 mM TRIS pH 8,0. 10 der insgesamt 52 Fraktionen enthielten 93% der Gesamtmenge an eingesetztem Procathepsin L. Sie wurden im Anschluss gepoolt und bis zur Autoprozessierung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Somit konnten, wie vorgesehen, Reinigung (um den Faktor 1,14) und Konzentrierung (um den Faktor 25) zugleich durchgeführt werden.

## 5.5 Autokatalytische präparative Prozessierung von Procathepsin L

Wie einleitend in Abschnitt 5.2 schon beschrieben, stellt die heterokatalytische Prozessierung von Procathepsin L durch Pepsin im präparativen Maßstab nicht unbedingt das optimale Verfahren dar. In der Literatur gab es Hinweise, dass Procathepsin L bei einem  $\text{pH} \leq 5,5$  selbst seine Proregion zerstört (Mason et al. 1992, Nomura et al. 1997, Ishidoh und Kominami 1994). In zwei aufeinanderfolgenden Versuchsreihen, von denen nur die zweite in Abbildung 27 dargestellt ist, untersuchte ich die Autoprozessierung von Procathepsin L im

Temperaturbereich zwischen 22 und 40°C und im pH-Bereich zwischen 3,5 und 4,6. Um den pH-Wert von 8,2 im Renaturierungsmedium auf  $\leq 4,6$  zu senken, wurde den Ansätzen konzentrierte Natriumzitratlösung pH 3,0 zugesetzt, zusätzlich noch 1 mM EDTA und 2 mM DTT, die zur Stabilisierung des Enzyms dienten. Die pH-Einstellung erfolgte im Eisbad. Nach dem Start der Beobachtung beim Überführen in Wasserbäder der jeweiligen Temperatur wurden im Abstand von etwa 5 Minuten Proben zur Messung der Cathepsin L-Aktivität (Mikrotiterplattentest) und zur Kontrolle der proteolytischen Umwandlung (SDS-Page) entnommen. Nur bei pH-Werten  $\leq 4,0$  und Temperaturen  $\geq 34^\circ\text{C}$  lief die Prozessierung in 2 Stunden vollständig ab.

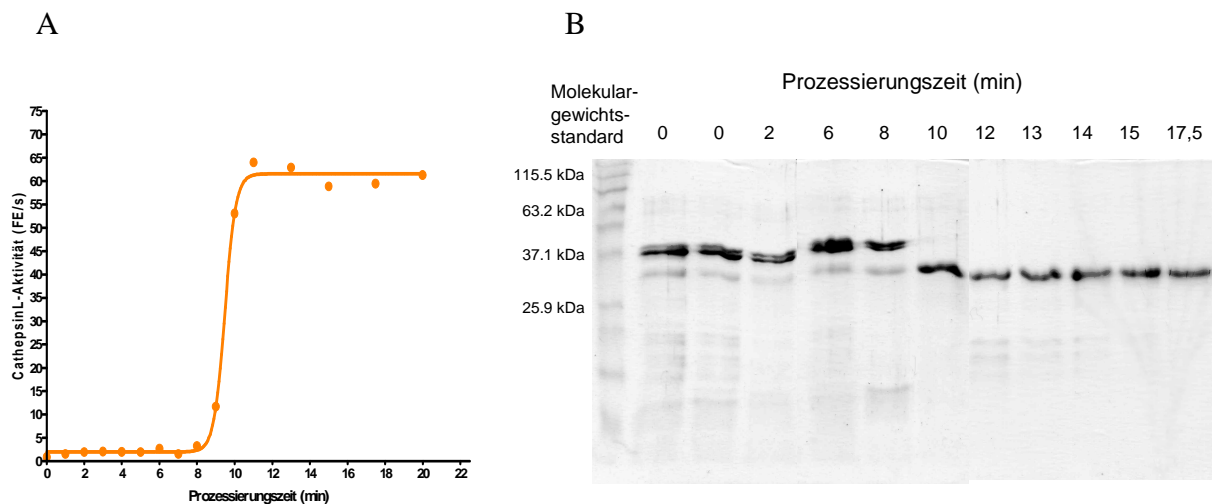


**Abbildung 27: Einfluss von Temperatur und pH-Wert auf die Autoprocessing von Procathepsin L.** Procathepsin L wurde bei zwei verschiedenen pH-Werten (3,5, 4,0) und vier verschiedenen Temperaturen (30°C, 34°C, 37°C, 40°C) inkubiert. Der pH-Wert wurde zuvor mithilfe konzentrierter Natriumzitratlösung pH 3,0 im Eisbad eingestellt, zusätzlich wurden noch 1 mM EDTA und 2 mM DTT zugesetzt. Nach dem Start der Inkubation wurde der Erfolg der Autoprocessing durch Aktivitätsmessungen (Mikrotests) in Aliquots ermittelt, die in einem Zeitraum von 50 Minuten entnommen wurden.

Abbildung 27 zeigt den Zeitverlauf der Cathepsin L-Entstehung während der Autoprocessing des Proenzym in den ersten 50 Minuten. Die exponentielle Skalierung der Ordinate soll die entscheidenden Ergebnisse deutlicher machen: Nach Lag-Phasen zwischen 5 und 25 min, in denen die Enzymaktivität nicht wesentlich zunimmt, kann man nur dann einen exponentiellen Anstieg beobachten, wenn entweder der pH  $< 4,0$  oder die Temperatur  $> 37^\circ\text{C}$  ist. Der exponentielle Verlauf ist dadurch bedingt, dass jedes entstandene Cathepsin L-Molekül seinerseits wieder Vorläufermoleküle spaltet. Der obere Grenzwert ist in allen Fällen identisch. Hier ist die Umwandlung des Proenzym vollständig. Erhebliche Unterschiede gibt es im Zeitverlauf. In einigen Proben kam es im beobachteten Zeitraum zu keinem messbaren Aktivitätsanstieg. Je höher jedoch die Temperatur und je niedriger der pH-Wert sind, desto rascher erfolgt der Umschlag vom ProcathepsinL zum reifen Enzym. Die Entscheidung für eine der vier erfolgreichen Bedingungen fiel schwer. Da bei einem pH-Wert von 3,5 zwischen 34°C und 40°C die gleichen hohen Ausbeuten gefunden wurden, sah ich eine Temperatur von



37°C bei pH 3,5 als guten Kompromiss zwischen schneller Prozessierung und konstanter und hoher Ausbeute an. Dieses Ergebnis stimmt auch mit den eingangs beschriebenen Literaturangaben überein und wurde deshalb bei den folgenden präparativen Prozessierungen verwendet. Neben pH-Wert und Temperatur hat auch die Procathepsin L-Konzentration im Prozessierungsansatz entscheidenden Einfluss auf den Zeitverlauf. Je höher sie ist, desto schneller erfolgt die Abspaltung der Proregion. Da die Cathepsin L-Präparation chargenweise erfolgte, waren unterschiedliche Proenzymkonzentrationen unvermeidlich. Deshalb wurde die Prozessierung jeder Charge so kontrolliert, wie das Abbildung 28 beispielhaft zeigt. Teilabbildung A zeigt den Zeitverlauf der gemessenen Aktivitäten, Teilabbildung B die Abspaltung der Proregion.



**Abbildung 28: Zusammenhang zwischen Aktivitäts- und Molekulargewichtsänderung bei der Autoprozessierung von Procathepsin L.** Die Autoprozessierung von Procathepsin L wurde bei pH 3,5 und 37°C durchgeführt und durch Messung der Cathepsin L-Aktivität (Mikrotiterplattentest) und durch Kontrolle der proteolytischen Umwandlung (SDS-Page) verfolgt. Dazu wurden in einem Zeitraum von 20 Minuten Aliquots entnommen. Abbildungsteil A zeigt den Zeitverlauf der Cathepsin L-Aktivität, Abbildungsteil B die Molekulargewichtsänderung im Elektrophoresegel (Coomassie-Färbung, Molekulargewichtsstandard: SeeBlue Plus 2 Pre-Stained Standard).

Die linke Darstellung illustriert die extreme Kooperativität im Verlauf der Autoprozessierung sehr gut. Zunächst ist über einen gewissen Zeitraum ein nur geringer Zuwachs der Enzymaktivität zu vermerken gefolgt von einem steilen Anstieg nach etwa 9 Minuten, der schon 1 Minute später in eine stationäre Phase mündet. In der Elektrophorese erkennt man den Prozessierungsverlauf sehr deutlich anhand der Änderung des Bandenmusters, der Abnahme der Intensität der höhermolekularen Procathepsin L-Bande parallel zur Zunahme der Cathepsin L-Bande mit dem geringeren Molekulargewicht. Nach 10

Minuten verschwindet die Procathepsin L-Bande, wie aufgrund der Aktivitätsbestimmung zu erwarten, vollständig. Die Prozessierung war damit also abgeschlossen. Die weitere Inkubation bis zu einer Gesamtzeit von 20 Minuten ist jedoch, wie die Elektrophorese zeigt, vorteilhaft, denn durch die proteolytische Aktivität des Enzyms werden alle Fremdproteine zerstört, so auch die Procathepsin L-Fragmente aus Abbildung 11. Auch durch densitometrische Auswertung konnten keine Nebenbanden nachgewiesen werden, es kann von einer Reinheit von nahezu 100% ausgegangen werden.

## **5.6 Bilanzierung der Herstellung des Cathepsin L**

Nach der Optimierung jedes Einzelschritts zur Herstellung von rekombinantem humanen Cathepsin L wurde die Effizienz des genannten Verfahrens viermal hintereinander zur Herstellung möglichst großer Enzymmengen geprüft. Dabei wurde jeder Schritt bilanziert, grundsätzlich über die Menge an Protein, und falls möglich über die Enzymaktivität. Tabelle 5 zeigt eine solche Bilanz beispielhaft für eine Charge. Die finale Enzymlösung besitzt, wie bereits in Abschnitt 5.5 erwähnt, eine Reinheit von etwa 100%. Den größten Effekt auf dieses Ergebnis hatten die einfachen Waschungen und die Behandlung mit DNase und Triton X-100. Auch die hydrophobe Interaktionschromatographie, die v.a. der Volumenreduktion dienen sollte, führte zu einer guten Steigerung der Reinheit. Bei der Autoprozessierung konnten wie in Abschnitt 5.5 beschrieben auch letzte, grobe Verunreinigungen entfernt werden. Während der einzelnen Schritte der Herstellung kam es, mit Ausnahme der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation, zu geringen Verlusten an (aktivem) Cathepsin L. Der empfohlene Verzicht auf die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation beeinflusst, wie in einem Experiment bewiesen, nicht die Reinheit der Präparation (Abbildung 13), reduziert jedoch die Verluste an Enzymprotein um zwei Drittel. Der Verlust an Cathepsin L-Menge durch die Autoprozessierung ist nur ein scheinbarer, da durch die Abspaltung des Propeptids gleiche Molekülzahlen mit niedrigeren Molmassen einhergehen. Die Ausbeute während der Präparationsschritte ist mit etwa 65% ähnlich der die Smith und Mitarbeiter erreichten, die Procathepsin L-Menge des finalen Präparats ist aber 16fach höher (Smith und Gottesman 1989).

**Tabelle 5: Überblick über die Procathepsin L-Mengen und -Aktivitäten sowie die Reinheit der Enzymlösung und die jeweiligen Ausbeuten bei verschiedenen Schritten der Herstellung.**

Präparationsschritt	Menge (mg)	Aktivität <sup>*3</sup> (μmol/min)	Reinheit <sup>*1</sup> (%)	Ausbeute (% der Aktivität)
im gesamten Bakterienprotein	---	---	15	---
im unlöslichen Bakterienprotein	---	---	25	---
nach Waschung, Behandlung mit DNase und Triton X-100	35,98 <sup>*1</sup>	---	65	---
nach Reinigung (Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation)	12,32 <sup>*1</sup>	---	65	100
nach Renaturierung	9,21 <sup>*1</sup>	268,2	65	74,76
nach HIC	9,06 <sup>*2</sup>	203,4	74	73,55
nach Autoprozessierung	8,01 <sup>*2</sup>	183,2	~ 100	65,02

<sup>\*1</sup> Densitometrische Proteinbestimmung nach elektrophoretischer Auftrennung.

<sup>\*2</sup> Bradford-Proteinbestimmung, die ihrerseits durch eine densitometrische Proteinbestimmung normiert wurde.

<sup>\*3</sup> Fluorometrische Aktivitätsmessungen in Mikrotiterplatten.

## 5.7 Charakterisierung des rekombinant hergestellten Procathepsin L bzw.

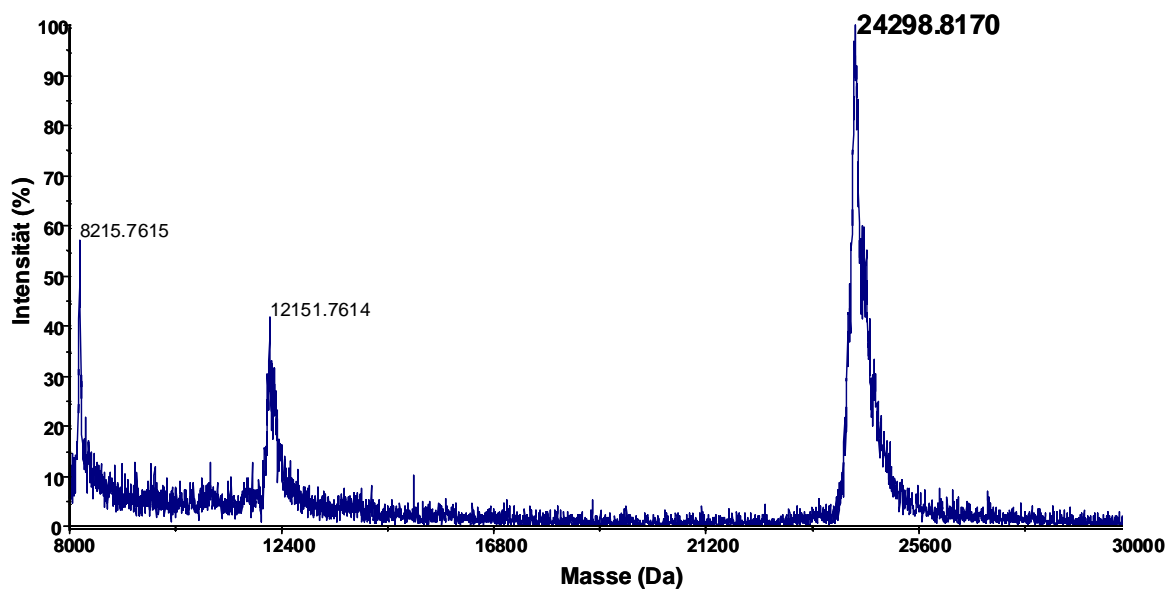
### Cathepsin L

Alle vier Cathepsin L-Chargen wurden bezüglich Reinheit und enzymatischer Aktivität getestet sowie mit E64 titriert. Die elektrophoretische Auftrennung zeigte stets das erwartete Molekulargewicht und eine Reinheit von etwa 100%.

Die finale Ausbeute bei der in Tabelle 5 beispielhaft bilanzierten Präparation betrug etwa 8 mg Cathepsin L, von denen sich nach Titration mit E64 1,96 mg als aktives Enzym erwiesen. Das entspricht einem Anteil von rund 25%. Bei einer anderen Charge wurden sogar

57% aktives Enzym erreicht, ein gutes Ergebnis im Vergleich zu Literaturangaben (Dolinar et al. 1995: 30% bei Cathepsin L, Barrett et al. 1982: 53% bei Cathepsin B).

Nach der erfolgreichen Autoprozessierung, die ausführlich im Abschnitt 5.5 beschrieben ist, wurde das finale Enzympräparat einer umfangreichen Charakterisierung unterzogen. Die Auswertung einer Matrix-unterstützten Laser-Desorptions-Ionisations-Massenspektroskopie (**MALDI**) des Cathepsin L ergab das erwartete Molekulargewicht von 24298,8 Da. Abbildung 29 zeigt das Spektrum:



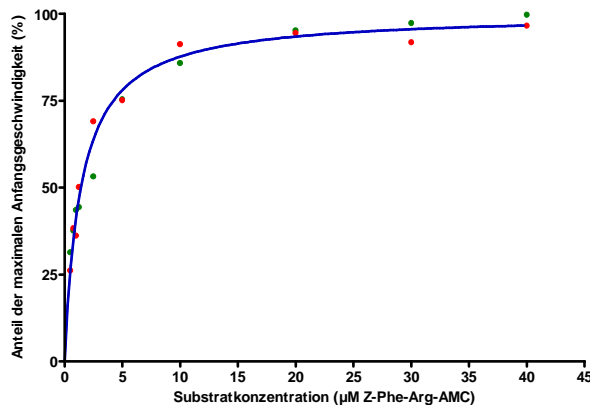
**Abbildung 29: MALDI-Analyse des rekombinant hergestellten Cathepsin L.** Die massenspektroskopische Untersuchung wurde von einer technischen Mitarbeiterin des eigenen Instituts durchgeführt. Die Cathepsin L-Proben wurden zuvor über Zip-Dip von Salzen gereinigt und anschließend 1:1 mit Matrix vermischt (20 mg/ml Sinabinsäure, 45% Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure). 2 µl davon wurden auf den Objektträger gegeben und vermessen.

Die MALDI-Untersuchung wurde durch eine N-terminale **Aminosäuresequenzierung** des rekombinanten Cathepsin L ergänzt, die folgende Sequenz ergab:

Glutamat – Alanin – Prolin – Arginin - ...

Diese passt zum ermittelten Molekulargewicht und stimmt mit der Datenbanksequenz und der Prozessierungsstelle vor dem Glutamat 1 überein. Die lysosomale Form des Enzyms beginnt, wie alle lysosomale Proteine, mit der Sequenz X-Prolin-. Das endständige Glutamat wird durch Exopeptidasen im Lysosom abgespalten. *In-vitro* fehlen diese Enzyme und Glutamat bleibt erhalten.

Der  **$K_M$ -Wert** von zwei selbst hergestellten Cathepsin L-Chargen wurde wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben, ermittelt (Abbildung 30) und mit Literaturangaben verglichen. Mein Wert liegt mit  $1,414 \mu\text{M}$  zwischen den publizierten Werten ( $1,1 \mu\text{M}$  Smith und Gottesman 1989;  $1,7 \mu\text{M}$  Nomura et al. 1996).



**Abbildung 30: Ermittlung des  $K_M$ -Werts von humanem Cathepsin L.** Die Werte stammen aus zwei unabhängigen Versuchsreihen mit unterschiedlichen Cathepsin L-Chargen. Zur Normierung dienten die jeweils individuell ermittelten  $v_{\max}$ -Werte, mit den normierten Daten wurde ein  $K_M$  von  $1,414 \pm 0,1 \mu\text{M}$  berechnet.

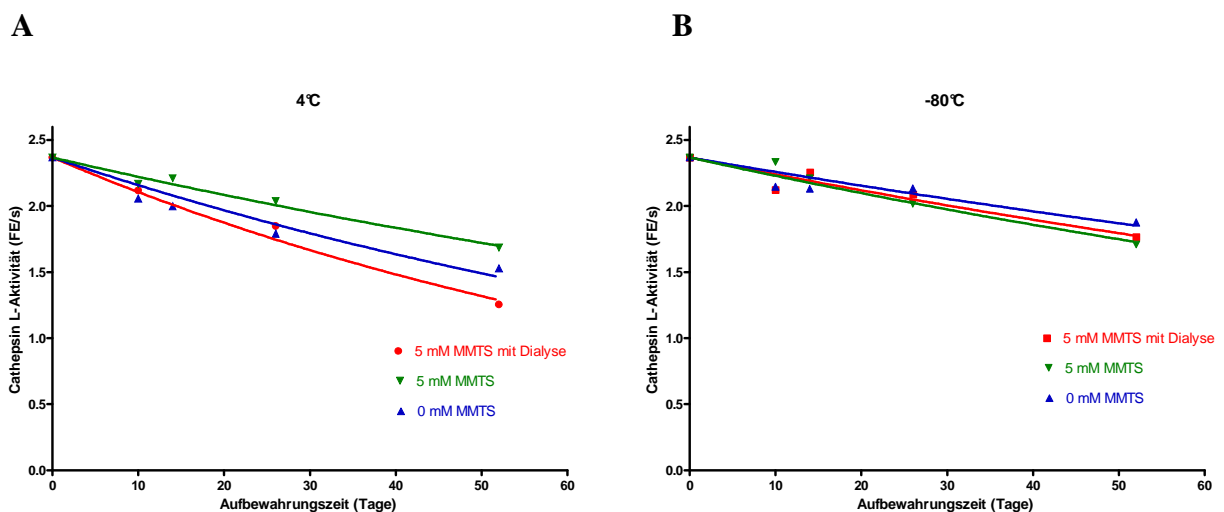
Der  **$k_{\text{cat}}$ -Wert** wurde durch Mikrottests (Abschnitt 4.2.3) bei Raumtemperatur für drei verschiedene Chargen ermittelt und die Ergebnisse anschließend gemittelt. Ich errechnete  $51,23 \pm 0,95 \text{ s}^{-1}$ , einen im Vergleich zu Literaturdaten hohen Wert. Nomura und Mitarbeiter untersuchten ebenfalls rekombinantes Enzym aus E.coli und maßen  $50 \text{ s}^{-1}$  bei  $30^\circ\text{C}$  (Nomura et al. 1996), Smith und Mitarbeiter ermittelten bei der gleichen Temperatur einen  $k_{\text{cat}}$  des rekombinanten Enzyms aus Mausmyelomzellen von  $39 \text{ s}^{-1}$  (Smith und Gottesman 1989). Das von Mason und Mitarbeitern aus der menschlichen Leber isolierte Enzym hatte allerdings nur einen  $k_{\text{cat}}$  von  $17 \text{ s}^{-1}$  (Mason et al. 1986). Da in die Berechnung von  $k_{\text{cat}}$ -Werten drei Teilmessungen ( $v_{\max}$ ,  $[E]$  und Fluorometereichung) einfließen, dürfen diese Differenzen nicht überbewertet werden (Übersicht bei Nomura et al. 1996).

### Stabilität des rekombinanten humanen Cathepsin L

Da es in der Literatur zahlreiche Hinweise auf eine geringe Stabilität von humanen Cathepsin L gab (Mason et al. 1987, Nomura und Fujisawa 1997), sollte die Stabilität des hergestellten Enzyms mit und ohne Zusatz des reversiblen Inhibitors MMTS verglichen werden. MMTS blockiert freie Sulfhydrylgruppen, bei Cysteinproteasen das katalytische Zentrum und verhindert so dessen irreversible Inaktivierung durch Oxidation (Smith et al. 1975). Es wurde bereits erfolgreich zur Stabilisierung von humanem Cathepsin X (Nägler et

al. 1999) verwendet. Es zeigte sich, dass vor der Durchführung von Aktivitätsmessungen mit dem reversibel inhibierten Enzym die Entfernung von überschüssigem Inhibitor nicht notwendig ist, wie das in der Literatur empfohlen wird (Smith et al. 1975). Die Hemmwirkung von MMTS wird durch die starke Verdünnung der Enzymlösung im DTT-haltigen im Testpuffer sofort aufgehoben. Das vereinfachte den Arbeitsablauf erheblich.

Um den stabilisierenden Effekt vom MMTS auf Cathepsin L zu prüfen, wurden drei Ansätze einer Enzymkonzentration von 600 nM hergestellt, eine Kontrolle und zwei Ansätze mit 5 mM MMTS. Aus einem der beiden wurde anschließend nicht kovalent gebundenes MMTS entfernt. Dazu nutzte ich aber eine Dialyse, die bei den geringen Volumina praktikabler als die von Smith und Mitarbeitern genutzte Gelfiltration war. Die Ansätze wurden anschließend geteilt und bei 4°C bzw. -80°C mehrere Wochen aufbewahrt. Im Abstand von einigen Tagen bis Wochen wurde die Aktivität in Aliquots der Ansätze gemessen.

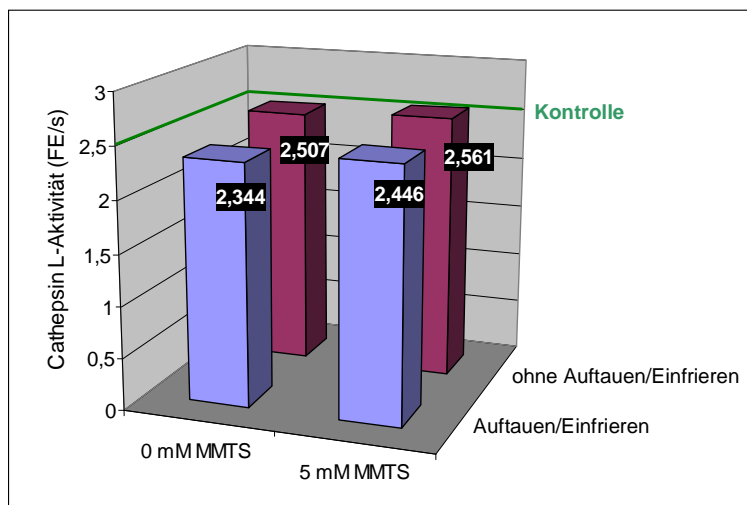


**Abbildung 31: Einfluss von MMTS auf die Stabilität von Cathepsin L.** Cathepsin L wurde durch 1:100 Verdünnung mit Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 auf eine Endkonzentration von 600 nM gebracht und auf drei Ansätze verteilt. Einer diente als Kontrolle, die beiden anderen wurden mit 5 mM MMTS versetzt. Zur Entfernung von ungebundenem MMTS wurde einer davon anschließend eine Stunde dialysiert (Servapor-Membran). Die Ansätze wurden jeweils geteilt und bei 4°C (Abbildungsteil A) bzw. -80°C (Abbildungsteil B) aufbewahrt. In größeren Abständen wurde die Aktivität in Aliquots in Makrotests, wie in der Methodik beschrieben, gemessen.

Abbildung 31 zeigt, dass die Aktivitätsverluste im Beobachtungszeitraum sogar bei Lagerung im Kühlschrank vergleichsweise gering waren. Wie zu erwarten, ist die Aufbewahrung bei -80°C aber etwas günstiger. Eine geringe stabilisierende Wirkung von MMTS zeigt sich nur bei 4°C. Bei dieser Temperatur ist die Halbwertszeit des Aktivitätsverlustes der mit einem Überschuss an MMTS versetzten Probe ist mit etwa 100 Tagen etwas besser als die

der beiden anderen (ca. 60 bzw. 75 Tage). Bei Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bringt MMTS im untersuchten Zeitraum keine zusätzliche Stabilisierung, im Mittel fand ich in den drei Ansätzen eine Halbwertszeit von etwa 130 Tagen.

Literaturdaten lassen auch Aktivitätsverluste von Cathepsin L durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen erwarten (Brömme et al. 2004). Das wurde ebenfalls experimentell geprüft. Dazu wurden Enzymverdünnungen mit und ohne MMTS entweder durchgehend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt oder täglich einmal aufgetaut. Nach 4 Tagen wurden die Aktivitäten verglichen. Abbildung 32 zeigt das Ergebnis:



**Abbildung 32: Einfluss von MMTS auf den Aktivitätsverlust von Cathepsin L durch Frieren / Tauen.** Eine 600 nM Enzymverdünnung in Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 wurde auf vier Ansätze verteilt, von denen zwei mit 5 mM MMTS versetzt wurden. Nur jeweils eine der Proben mit und ohne MMTS (rote Säulen) wurde täglich eine Stunde lang bei Raumtemperatur aufbewahrt, in der übrigen Zeit wie die beiden anderen (blaue Säulen) bei

bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Nach 4 Tagen wurden die Aktivitäten der 4 Ansätze im Makrotest auf die in der Methodik beschriebene Weise gemessen, und die stationären Geschwindigkeiten nach Gleichung 1 bestimmt. Zur Normierung ist das Ergebnis einer Kontrollmessung, die unter den gleichen Bedingungen zu Beginn des Experiments vorgenommen wurde, als grüne Linie in die Grafik eingefügt.

Man erkennt, dass die Aktivität in den wiederholt aufgetauten Proben geringer ist, als die in den konstant bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten. Der Zusatz von 5 mM MMTS führt zu einer leichten Verbesserung der Stabilität, minimale Aktivitätsverluste durch häufiges Auftauen und Einfrieren sind aber dennoch nicht zu vermeiden.

## 6. Diskussion

Cathepsin L ist Namensgeber einer Unterfamilie der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen. Die Proregionen dieser Enzyme sind zwar multifunktionell, ihre vordergründige Funktion ist aber offensichtlich die Inhibition der Aktivität ihrer Mutterenzyme, wodurch sie eine unerwünschte Proteolyse vor Erreichen des Wirkortes verhindern. Die Prozessierung von Procathepsin L zum aktiven Enzym erfolgt auf dem Weg ins Lysosom, dem physiologischen Wirkort. Der sinkende pH-Wert führt zur autokatalytischen Abspaltung der Proregion. Proregionen im freien, nicht-kovalent gebundenen Zustand werden als Propeptide bezeichnet und sind ebenfalls in der Lage, ihre Mutterenzyme hochaffin zu hemmen (Mason et al. 1987, Fox et al. 1992, Li et al. 1995, Volkel et al. 1996, Maubach et al. 1997, Nomura et Fujisawa 1997, Visal et al. 1998, Billington et al. 2000, Guay et al. 2000).

Proregionen bzw. Propeptide verlängern außerdem die Lebensdauer ihrer Mutterenzyme, so sind die Enzym-Propeptid-Komplexe v.a. bei neutralem pH wesentlich stabiler als die freien Proteasen (Mason et al. 1987; Nomura et Fujisawa 1997).

Eine dritte Funktion ist die Zielsteuerung der Cysteinproteasen während der Biosynthese (Tao et al. 1994, McIntyre et al. 1994, Chapman et al. 1997, Nissler et al. 1998), die allerdings eng mit der vierten Funktion, der sogenannten Foldasefunktion zusammenhängt, wie das für Cathepsin B bereits gezeigt wurde (Muntener et al. 2004, 2005). Die Fehlleitung von Proenzymen mit mutierten Proregionen in der Zelle könnte so lediglich ein sekundärer Effekt einer inkorrekten Faltung sein (Tao et al. 1994). Generell können nur korrekt gefaltete Proteine das Endoplasmatische Retikulum verlassen, im Golgi-Apparat durch Mannose-6-phosphat-Gruppen markiert und schließlich in die Lysosomen transportiert werden (Sandoval und Bakke 1994; Zhang et al. 1997). *In-vivo* Untersuchungen mit den Procathepsinen L und S mit fehlenden, verkürzten oder mutierten Proregionen bestätigten sowohl das (Tao et al. 1994; Kreusch et al. 2000) als auch die essentielle Rolle der Proregion für die korrekte Faltung der Proteasen (Smith and Gottesman 1989, Ogino et al. 1999). Der *in-vitro* Nachweis der Foldasefunktion der humanen Cathepsine S und K erfolgte in der eigenen Arbeitsgruppe (Pietschmann et al. 2002, Sehmisch 2005). Dabei wurde die Propeptid-Abhängigkeit der Renaturierung der zuvor denaturierten Enzyme in sogenannten *trans*-Experimenten, bei denen das freie Propeptid dem Renaturierungsansatz zugesetzt worden war, untersucht. Yamamoto et al. gelang 1999 ähnliches für das Propeptid von Cathepsin L aus Seidenraupen. Dies warf die Frage nach der Spezifität dieser Foldasefunktion auf, also ob die Propeptide ausschließlich die Faltung ihres Mutterenzyms oder auch die von eng oder entfernt verwandten Mitgliedern



der Papainfamilie katalysieren können. Erste Über-Kreuz-Versuche in *trans*-Experimenten mit den nahe verwandten Cathepsinen S und K sprachen für die absolute Spezifität der beiden Propeptide bei der Faltungskatalyse (Sehmisch 2005). Um die Allgemeingültigkeit dieser Beobachtung zu prüfen, sollten solche Untersuchungen auf das entfernter verwandte Cathepsin L ausgedehnt werden. Sie sind jedoch nur dann aussagekräftig, wenn die Primärstruktur des Enzyms *in-vitro* mit der des nativen Enzyms *in-vivo* übereinstimmt. Das war das Problem bei der Planung dieser Versuche, denn humanes Cathepsin L ist kommerziell lediglich als aus Lysosomen menschlicher Leber isoliertes bzw. als rekombinant hergestelltes Enzym mit His-Tag erhältlich (Calbiochem). Beide Formen können nicht für die beschriebenen Faltungsexperimente verwendet werden: das Enzym aus der Leber liegt hauptsächlich als Zwei-Ketten-Form vor, dessen enzymatische Aktivität zwar unverändert ist, dessen Rückfaltung nach Denaturierung aber sehr wahrscheinlich aufgrund der zerstörten Primärstruktur nicht gelingt, und das His-Tag des rekombinanten Enzyms könnte Faltungsvorgänge auf unvorhersehbare Weise beeinträchtigen. Die proteolytische Abspaltung des His-Tag wäre zwar prinzipiell möglich gewesen, wir sahen aber in der Eigenproduktion von Cathepsin L unter Verwendung des sehr ökonomischen E.coli-Expressionssystems die langfristig günstigere Variante, zumal in der eigenen Arbeitsgruppe bereits die Expression von humanem Procathepsin S sowie der Propeptide der Cathepsine S und K in E. coli gelungen war (Kramer in Vorbereitung, Maubach et al. 1997, Schlabrakowski 2003). Die Optimierung des bei einer solchen Vorgehensweise unumgänglichen *cis*-Renaturierungsschrittes erschien uns als eine ideale Vorarbeit für die ohnehin erforderliche Etablierung der *trans*-Renaturierung. Aufgrund der Beteiligung von Cathepsin L an zahlreichen physiologischen und pathologischen Proteolysevorgängen im menschlichen Körper wächst die Nachfrage nach diesem Enzym ständig, so dass, wie sich inzwischen bestätigte, das überschüssig produzierte Cathepsin L sehr gut für wissenschaftliche Kooperationsprojekte nutzbar ist. In der Literatur sind bereits einige Expressionsversuche von Procathepsin L in E. coli beschrieben (Brömme et al. 2004, Smith und Gottesman 1989, Dolinar et al. 1995, Yamamoto et al. 1999). Vorteile der rekombinanten Herstellung von Proteinen in E. coli sind die einfache Handhabung und Manipulation der Bakterienstämme und ihr schnelles Wachstum in preisgünstigen Nährmedien (Brömme et al. 2004). Smith et Gottesman entdeckten 1989 die gute Eignung des E. coli-Stamms BL21(DE3), der die Expression unter der Kontrolle des T7-Promotors ermöglicht. Dolinar et al. (1995) und Brömme et al. (2004) verwendeten einige Jahre später erfolgreich den modifizierten Stamm BL21(DE3)pLysS, den auch ich genutzt habe. Ein Plasmid mit der cDNA des Procathepsin L stand zur Verfügung (Abudula 2001), die

codierende DNA-Sequenz musste nur noch in einen zur Expression geeigneten Vektor umklont werden. All das sprach ebenfalls für die Eigenproduktion.

Die Expression erfolgte nach einem bewährten Standardprotokoll und führte in den Bakterienzellen zur Ablagerung des rekombinanten Enzyms in Form von Einschlusskörperchen (inclusion bodies), das sind kompakte mikroskopisch sichtbare Proteinkonglomerate. Das rekombinante Enzym repräsentierte 25% des totalen Bakterienproteins. Dies ist wesentlich mehr, als bei Dolinar et al. (1995), die ca. 5% - 10% erreichten. Dass es, wie von den gleichen Autoren beschrieben, auch ohne IPTG-Induktion zu einer basalen Expression kommt, konnte ich bestätigen. Die Einschlusskörperchen wurden durch Ultraschall-Zellaufschluss gewonnen und, einem weiteren Standardprotokoll folgend, erst durch einfache und anschließend noch durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigt (Coligan et al. 2003). Ich beobachtete, dass die Einschlusskörperchen schon nach der einfachen Waschung sehr rein vorlagen (65%), so dass die Notwendigkeit einer Dichtegradienten-Zentrifugation zweifelhaft war. In einem Zusatzexperiment habe ich deshalb die Aufarbeitung mit und ohne diesen aufwändigen Schritt verglichen und gezeigt, dass ein vereinfachtes Protokoll die Reinheit des Produkts nicht verändert (65%, Tabelle 5). Die Einschlusskörperchen konnten nur mit Guanidinhydrochlorid vollständig gelöst werden. Da die Optimierung der Rückfaltung des Procathepsin L ein zentrales Thema meiner Arbeit werden sollte, war dieser Denaturierungsschritt aber kein Nachteil.

Vor Beginn der Renaturierungsexperimente musste eine geeignete Methode zum Nachweis der erfolgreichen Renaturierung, also der Wiederherstellung der Struktur von Procathepsin L gefunden werden. Die Aktivitätsmessung stellt hierbei das sicherste Verfahren dar (Rudolph et al. 1997, Sarat et al. 1994), da sie sowohl sehr praktikabel als auch hochsensitiv ist. Sie erfolgte in Mikrotiterplatten mittels fluorometrischer Messung der AMC-Abspaltung vom synthetischen Peptidsubstrat Z-Phe-Arg-AMC unter Bedingungen, die auf den methodischen Erfahrungen mit Procathepsin S basierten (Kramer in Vorbereitung). Bezüglich des Substrats und des pH wurden entsprechende Literaturangaben zum Procathepsin L berücksichtigt (Barret und Kirschke 1981, Kirschke et al. 1995, Smith et Gottesmann 1989).

Da Procathepsin L nach der *cis*-Renaturierung durch seine Proregion blockiert ist, musste diese vor der Aktivitätsmessung entfernt werden. In der eigenen Arbeitsgruppe wird sowohl diese sogenannte analytische Prozessierung bei Procathepsin S (Kramer in Vorbereitung) als auch der spezifische Abbau der ungebundenen Propeptide, das sogenannte Clearing, bei den Cathepsinen S und K seit einigen Jahren erfolgreich mit Pepsin realisiert

(Kleint 2004, Sehmisch 2005). In den letzten Jahren wurden auch Verfahren zur gentechnischen Herstellung von Cathepsinen publiziert, bei denen das Zymogen mit Pepsin in Konzentrationen zwischen 1,39  $\mu\text{M}$  und 16,6  $\mu\text{M}$  erfolgreich zum reifen Enzym prozessiert wurde (Nishimura et al. 2002, Brömme et al. 2004, Linnevers et al. 1997, Hou et al. 1999). All dies wurde bei der Optimierung der Procathepsin L-Prozessierung durch systematische Variation von Pepsin-Konzentration, Temperatur und Prozessierungszeit berücksichtigt. Ich ermittelte eine optimale Pepsinkonzentration von 40  $\mu\text{M}$ , etwas höher als die Literaturangaben. Diese hohen Einsätze sind nötig, weil die Prozessierungsreaktion aufgrund des bekannten Stabilitätsverlusts der Cathepsine in stark saurem Milieu nicht am pH-Optimum des Pepsins stattfinden konnte. Mit wachsender Entfernung vom pH-Optimum nimmt einerseits die Reaktionsspezifität von Pepsin zu, aber seine Wirksamkeit ab, so dass es im mikromolaren Konzentrationsbereich eingesetzt werden muss.

Aufbauend auf den Erkenntnissen aus Renaturierungsversuchen mit Procathepsin S, Cathepsin S und Cathepsin K in der eigenen Arbeitsgruppe und auf Literaturdaten zum Procathepsin L (Yamamoto et al. 1999, Dolinar et al. 1995, Smith et Gottesmann 1989) plante ich die Experimente zur Optimierung der Renaturierungsbedingungen. Aufgrund der Vielzahl möglicher Einflussfaktoren verwendete ich überwiegend zentral zusammengesetzte Versuchspläne 2. Ordnung, mit denen gleichzeitig mehrere Faktoren und auch deren Wechselwirkungen untersucht werden können (Rechnerprogramm CADEMO). Dieses statistische Verfahren wurde bereits erfolgreich bei den *cis*- und *trans*-Renaturierungsexperimenten mit den Cathepsinen S und K eingesetzt (Kramer in Vorbereitung, Sehmisch 2005). Ich musste bei der Auswertung aber gelegentlich feststellen, dass die Berechnung plausibler Optima unmöglich wurde, wenn nur eine geringe oder keine Abhängigkeit von den untersuchten Faktoren vorlag und die höchsten Messwerte teilweise zufällig auf zwei benachbarte Sternpunkte fielen. In diesen Fällen war eine Wiederholung des Versuchs mit veränderten Konzentrationsbereichsgrenzen unumgänglich. Dabei ergänzte ich aber die Messpunkte des zentral zusammengesetzten Versuchsplans durch die Eckpunkte des entsprechenden vollständigen Versuchsplans. So konnte ich einen Kompromiss zwischen einer zuverlässigeren Aussage und dennoch akzeptablem Messaufwand finden, also eine mögliche Fehlerquelle eliminieren und damit das experimentelle Vorgehen optimieren.

Die Ergebnisse meiner *cis*- Renaturierungsexperimente werden in Tabelle 6 mit den in der eigenen Arbeitsgruppe gefundenen optimalen *trans*-Renaturierungsbedingungen für Cathepsin L (Körner in Vorbereitung) sowie mit Ergebnissen von *trans*- und *cis*-Versuchen anderer Arbeitsgruppen verglichen (Dolinar et al. 1995, Yamamoto et al. 1999). Zusätzlich

sind auch die optimierten Bedingungen für die *cis*-Renaturierung des nahe verwandten Cathepsin S mit aufgeführt (Kramer in Vorbereitung).

**Tabelle 6: Vergleich der optimalen Renaturierungsbedingungen der *cis*- und *trans*-Renaturierung des Procathepsin L sowie der *cis*-Renaturierung von Procathepsin S.**

Faktor	Einheit	<i>cis</i>			<i>trans</i>	
		Cathepsin S	Cathepsin L			
TRIS	mM	1000	100	192	50	-
Kaliumphosphat	mM	-	-	-	-	50
Arginin	mM	1000	-	-	-	-
GSH	mM	20	-	8,35	4	1
GSSG	mM	10	-	7,4	0,5	0,1
Cystein	mM	-	3	-	-	-
Cystin	mM	-	0,1	-	-	-
pH		8	8,0	8,2	7,75	10,7
MgSO <sub>4</sub>	mM	-	-	-	300	-
MgCl <sub>2</sub>	mM	-	-	400	-	-
Brij 35	%	-	-	0,07	-	-
Chaps	%	-	-	-	0,05	-
Triton X-100	%	-	0,015	-	-	-
Propeptid	μM	entfällt			2 - 4	keine Angabe
Temperatur	°C	16	keine Angabe	19	15	4
Zeit	h	24	keine Angabe	3	20	über Nacht
EDTA	mM	2	-	2	2	5
Acid	%	0,02	-	-	0,02	-
Methode		Verdünnung	Dialyse	Verdünnung	Verdünnung	Verdünnung
Ausbeute		15% *	4%	75%	47%	keine Angabe
Literaturzitat		Kramer (in Vorbereitung)	Dolinar et al. (1995)	eigene Versuche	Körner (in Vorbereitung)	Yamamoto et al. (1999)

\* ohne Berücksichtigung möglicher Verluste beim Prozessierungsschritt

Es fällt auf, dass sich die optimalen Renaturierungsbedingungen von Procathepsin L und Procathepsin S trotz der vergleichsweise engen Verwandtschaft der Enzyme stark unterscheiden. Während für die *in-vitro*-Faltung von Procathepsin L lediglich kleine TRIS-

Konzentrationen nötig sind, liegen die optimalen Werte für das Procathepsin S-Renaturierung zehnfach höher, Arginin muss beim Procathepsin S in hohen Konzentrationen zugegeben werden, beim Procathepsin L spielt es keine Rolle. Die optimalen Bedingungen der *trans*- und *cis*-Renaturierung von Cathepsin L sind sich hingegen bezüglich des Einflusses von TRIS- und Arginin-Konzentrationen sehr ähnlich. Auch das Kation  $Mg^{2+}$  hat in beiden Fällen einen positiven Einfluss. Das entsprechende Anion ist jedoch verschieden: während die *trans*-Renaturierung am effektivsten mit  $MgSO_4$  abläuft, wird die *cis*-Renaturierungsausbeute durch Zusatz von  $MgCl_2$  gesteigert.

Procathepsin L verfügt über 3 Disulfidbrücken, auf deren korrekter Bildung der Renaturierungserfolg basiert. Reduziertes (GSH) und oxidiertes Glutathion (GSSG) bilden im Renaturierungsansatz ein Redoxsystem, welches in der Lage ist, die Lösung inkorrekt ausgebildeter Disulfidbrücken sowie die Bildung neuer Disulfidbrücken zu fördern (Disulfid-Reshuffling). Daher wurde die Optimierung der Konzentrationen des Redoxpuffers sowie des pH-Wertes des Renaturierungsmediums, von dem seine Wirkung aufgrund der Ionisation der SH-Gruppen abhängt, zuerst in Angriff genommen. Ein pH um etwa 8,0 sowie der Einsatz von GSSG und GSH fanden in den meisten der in Tabelle 6 gelisteten Ansätze Verwendung. GSSG, GSH und ein leicht alkalischer pH erwiesen sich auch in den eigenen Versuchen als hilfreich, eine Variation der Konzentrationen der beiden Redoxpartner bzw. des pH-Wertes war bei mir jedoch in einem unerwartet weiten Bereich ohne nachteiligen Effekt (Abbildung 23).

Detergenzien wie Brij, Chaps und Triton X-100 besitzen eine aggregationshemmende Wirkung, die auf einer Bindung an hydrophobe Oberflächenareale basiert. In allen *cis*-Ansätzen und dem *trans*-Ansatz von Körner (in Vorbereitung) mit Cathepsin L zeigten sie positive Effekte, in meinen Versuchen war Brij am effektivsten (Abbildung 20).

Salze können ebenso wie Saccharose und der Polyalkohol Glycerol die native Struktur des Enzyms stabilisieren, indem sie durch Ungleichverteilung im umgebenden Lösungsmittel eine thermodynamisch günstige Situation schaffen, die der Entfaltung entgegenwirkt. Dieser Effekt hängt jedoch immer vom jeweiligen Protein ab (Rudolph et al. 1997). Einen entscheidenden Beitrag zum Renaturierungserfolg in meinen Experimenten leistete  $MgCl_2$  (Abbildung 21 und 22), das die Ausbeute verdoppelte.

Unter den optimalen Bedingungen konnte ich eine Renaturierungsausbeute an Procathepsin L von etwa 75% erzielen, deutlich mehr als die in der Tabelle aufgeführten Werte und andere bisher für *cis*-Bedingungen publizierte Ergebnisse (Smith und Gottesman 1989: 2,5% bei Procathepsin L; D'Alessio et al. 1999: 52,6% bei Procathepsin K; Tobbell et

al. 2002: 35,6% beim Procathepsin S). Der Grund ist vermutlich die systematische Optimierung einer Vielzahl von Einflussfaktoren, die ich in ähnlicher Weise wie Kramer (in Vorbereitung) und Körner (in Vorbereitung) durchgeführt habe. Deshalb lassen sich die Ergebnisse in diesen drei Spalten von Tabelle 6 unmittelbar vergleichen. Dolinar et al. (1995) und Yamamoto et al. (1999) berichten zumindest in den zitierten Publikationen nicht über ein solches systematisches Vorgehen.

Da ich nach dem Verdünnungsprinzip renaturiert habe, war anschließend eine Volumenreduktion unumgänglich. Daher sollte ein chromatographischer Reinigungsschritt angeschlossen werden, wie er bereits erfolgreich beim Procathepsin S durchgeführt wurde (Kramer in Vorbereitung). Die hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) sollte zugleich die Reinheit erhöhen, das Volumen reduzieren, die Renaturierungszusätze und Proteinpräzipitate entfernen. Durch umfangreiche Voruntersuchungen wurden das optimale Trennmedium, Phenylsepharose-HP, bestimmt und die Konditionierungs-, Auftrags-, Wasch- und Elutionsbedingungen an die speziellen Eigenschaften des Procathepsin L angepasst. Ich stellte fest, dass die Hydrophobizität von Procathepsin L wesentlich geringer ist als die von Procathepsin S, daher konnte zur Elution der ansteigende Ethylenglykol-Gradient durch einen fallenden Ammoniumsulfat-Gradienten ersetzt werden. Das vereinfachte das Verfahren.

Zur Umwandlung des renaturierten Proenzym in reifes Cathepsin L musste die Proregion abgespalten werden. Die heterokatalytische Prozessierung durch Pepsin, die sich in der Analytik bewährt hatte, ist im präparativen Maßstab ungeeignet, da es dabei zur Verunreinigung mit einem Fremdenzym kommen würde, welches dann anschließend wieder abgetrennt werden müsste. In der Literatur gab es Hinweise, dass Procathepsin L bei einem  $\text{pH} \leq 5,5$  und einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  selbst seine Proregion zerstört (Mason et al. 1992, Nomura et al. 1997, Ishidoh und Kominami 1994). Diese Autoprozessierung bei saurem pH, die bereits zur präparativen Prozessierung des Procathepsin S eingesetzt worden war (Kramer in Vorbereitung) ließ sich auch beim Procathepsin L erfolgreich nutzen. In Vorversuchen konnte ich die Bedingungen (pH, Temperatur) für die Autoprozessierung so optimieren, dass die Ausbeute etwa vollständig war. Unter den optimierten Prozessierungsbedingungen zerstörte Cathepsin L auch sämtliche noch vorhandenen Fremdproteine, das war ein willkommener Nebeneffekt. Da die Cathepsin L-Präparation chargenweise erfolgte, waren unterschiedliche Proenzymkonzentrationen bei der Autoprozessierung unvermeidlich. Vermutlich deshalb hatte dieser Prozess einen sehr unterschiedlichen Zeitverlauf, die Prozessierungsgeschwindigkeit stieg parallel zur Proenzymkonzentration an. Wir stellten uns die Frage, ob man aufgrund dieser Beobachtung ermitteln kann, in welchem Umfang intramolekulare und

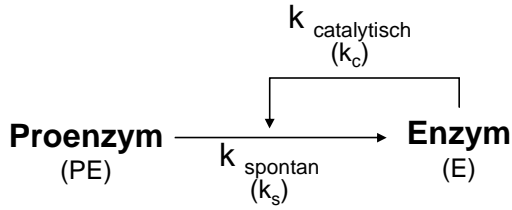
intermolekulare Prozesse an der Autoprocessing von Procathepsin L beteiligt sind. Dieses Problem wird in der Literatur kontrovers diskutiert, ohne dass bisher quantitative Ergebnisse publiziert wurden. Nomura und Mitarbeiter führten Untersuchungen mit einer Procathepsin L-Mutante durch, in welcher die Aminosäure Cystin 138 im aktiven Zentrum durch Serin ersetzt worden war, um einen intramolekularen Abbau der Proregion zu verhindern. Bei der Prozessierung dieser Mutante durch die Wildtypen von Procathepsin L und Cathepsin L bei pH 4,0 und 37°C fanden die Autoren nach elektrophoretischer Auftrennung keine deutliche Bande mit dem Molekulargewicht des reifen Cathepsin L und schlossen daraus, dass es sich bei der Autoprocessing um ein rein intramolekulares Phänomen handeln müsse (Nomura et al. 1997). Etwa zeitgleich arbeiteten Ménard und Mitarbeiter mit einer identischen Mutante am gleichen Problem und zeigten mit der gleichen Technik, dass diese sehr wohl durch Inkubation mit einer kleinen Menge an reifem Cathepsin L bei pH 5,1 und 25°C prozessiert wird. Zusätzlich wurden die Produkte des intermolekularen Prozessierungsschritts, reifes Enzym und Propeptid, noch einer N-terminalen Aminosäuresequenzanalyse unterzogen, das Propeptid außerdem einer Ionenspray-Massenspektrometrie. Auf diese Weise fanden sie heraus, dass nur eine einzige Peptidbindung hydrolysiert wird. Da die Tertiärstruktur des Procathepsin L den Autoren bekannt war, konnten sie aus diesen Daten die räumliche Lage der Prozessierungsstelle im Proenzym ermitteln, sie liegt in einer Schleife auf der Moleküloberfläche, ist also frei zugänglich, und weist eine Sequenz auf, die der Spezifität von Cathepsin L entspricht. Alle diese Beobachtungen sind ausgesprochen schlüssig und lassen keinen Zweifel an der Beteiligung intermolekularer Proteolyse bei der *in-vitro* Prozessierung von Procathepsin L zu. Die widersprüchlichen Ergebnisse von Nomura und Mitarbeitern könnten durch die autokatalytische Zerstörung des entstandenen Cathepsin L unter deren vergleichsweise harschen Inkubationsbedingungen (zu warm und zu sauer) verursacht worden sein. Da die Geschwindigkeit bimolekularer Reaktionen von der Kollisionswahrscheinlichkeit der Reaktanten abhängt, muss sie sich bei Verdünnung des Reaktionsansatzes proportional vermindern. Bei einer monomolekularen Reaktion bliebe sie konstant. Auch dieses Experiment wurde von Ménard und Mitarbeitern noch durchgeführt. Es gab prinzipiell das erwartete Ergebnis, die Regressionsgerade in der Darstellung der Prozessierungsgeschwindigkeit als Funktion der Zymogenkonzentration schnitt aber die Ordinate oberhalb von Null, ein möglicher Hinweis auf einen zweiten intramolekularen, also unimolekularen Prozessierungsmechanismus (Ménard et al. 1998).

Es erschien interessant, unter Berücksichtigung der eben ausführlich zitierten Vorarbeiten mit den ohnehin vorhandenen eigenen Daten eine Berechnung der Geschwindig-

keiten der beiden Teilreaktionen der Procathepsin L Autoprozessierung, der intermolekularen und der intramolekularen zu versuchen. Nach meinem Kenntnisstand sind solche Untersuchungen im Zusammenhang mit präparativen Autoprozessierungen bisher noch nicht veröffentlicht worden, denn üblicherweise wird nach einem feststehenden Protokoll gearbeitet (Brömme et al. 2004). Das entsprechende mathematische Modell ist vergleichsweise einfach (Schema 3), so dass sich leicht die Differenzialgleichung zur Beschreibung des Zeitverlaufs der Cathepsin L Bildung aus der Proform entwickeln läßt (Gleichung 9).

Abbildung 33 zeigt, dass sich der beobachtete Zeitverlauf gut mit dem Modell beschreiben lässt. Überraschend war dann allerdings, dass es für den Verlauf der berechneten Kurven unerheblich ist, ob man eine intramolekulare Teilreaktion berücksichtigt, die allerdings um mehr als 10 Größenordnungen langsamer wäre als die intermolekulare, oder ob man eine solche Reaktion ausschließt und statt dessen das Vorhandensein einer sehr kleinen Menge ( $10^{-11}$  der Gesamtmenge) an reifem Cathepsin L zu Beginn der Prozessierung annimmt. Die vom Optimierungsprogramm berechneten Konfidenzintervalle für die Parameter  $E_0$  bzw.  $k_s$  schließen jeweils die Null mit ein, so dass aus Experimenten dieser Art eine zuverlässige Bestimmung dieser beiden Parameter nicht möglich ist. Demgegenüber kann man mit einem Fehler kleiner 10% die Geschwindigkeit der katalysierten Umwandlung von Procathepsin L zum reifen Enzym bestimmen, sie liegt bei 37°C und pH 3.5 bei ca.  $27 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ . Diese für die bimolekulare Reaktion ermittelte Geschwindigkeit ist allerdings kein  $k_{\text{cat}}$  Wert nach den Definitionen der Enzymkinetik, sondern entspricht mit guter Näherung  $k_{\text{cat}} / K_M$  (exakt dem Produkt aus  $k_{\text{cat}}$  und  $K_{\text{ass}}$ , der Bildungskonstante des Komplexes aus Enzym und Proenzym). Ein Vergleich mit  $k_{\text{cat}} / K_M$  für den Umsatz des besten fluorogenen Substrates Z-Phe-Arg-AMC ( $29,4 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ , Nomura et al. 1996 bzw.  $35,45 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ , Smith und Gottesman 1989) durch humanes Cathepsin L zeigt, dass Cathepsin L seine Proform mit vergleichbarer Effizienz spaltet, wie andere Substrate auch. Eine solche vergleichende Abschätzung wurde bisher noch nirgends publiziert, das Ergebnis erscheint plausibel.

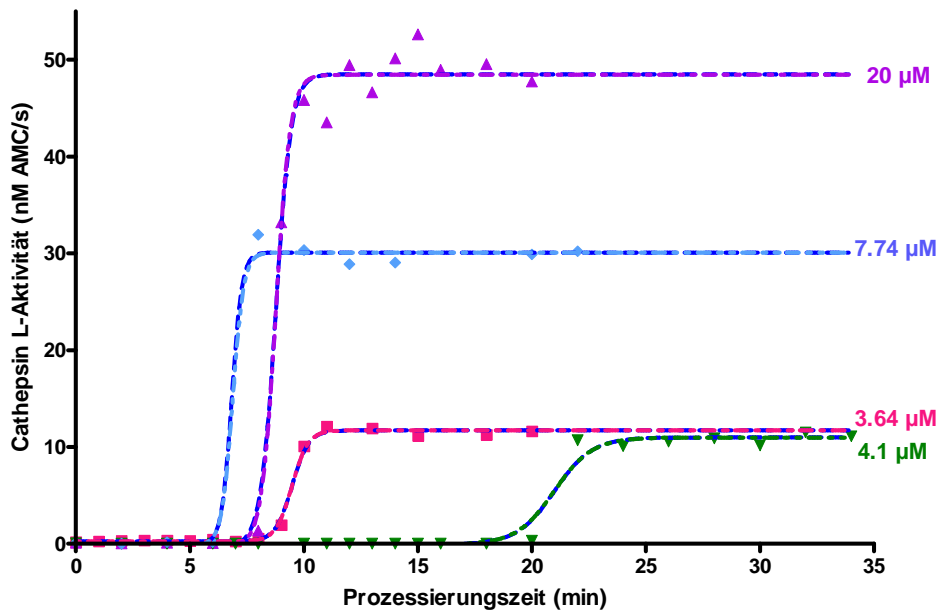




**Schema 3: Darstellung der beiden Teilreaktionen der Autoprozessierung**

$$\frac{dE}{dt} = PE * (E * k_c + k_s)$$

*Gleichung 9*



**Abbildung 33: Übersicht über den Autoprozessierungsverlauf bei verschiedenen Proenzymkonzentrationen.** Dargestellt ist die Cathepsin L-Aktivität als Funktion der Prozessierungszeit bei pH 3,5 und 37°C für vier Chargen, die sich in der Proenzymkonzentration zu Beginn der Prozessierung unterscheiden. Die entsprechenden Konzentrationen wurden durch E64-Titration ermittelt und sind an den jeweiligen Kurven vermerkt. Um die Berechnung der Geschwindigkeiten der intra- ( $k_s$ ) und intermolekularen ( $k_c$ ) Teilschritte der Reaktion durch nichtlineare Regression zu erleichtern, habe ich Gleichung 9 in der integrierten

$$E_{tot} - \frac{k_s * E_{tot} - E_0}{k_c} * e^{-(k_c * E_{tot} + k_s) * t}$$

Form benutzt:  $E - BW = \frac{E_{tot} - E_0}{1 + \frac{k_s}{k_c} + E_0} * e^{-(k_c * E_{tot} + k_s) * t}$

In dieser Form lassen sich noch zwei weitere Parameter problemlos definieren, einmal die Unsicherheit bei der Bestimmung von E durch geringe Unterschiede im Blindlauf des verwendeten Aktivitätstests (BW) und zum anderen das Vorhandensein einer sehr kleinen Menge an aktivem Enzym zu Beginn der Beobachtung ( $E_0$ ).  $E_{tot}$  ist die Summe aus E, PE und  $E_0$ , t ist die Inkubationszeit. Bei der mathematischen Auswertung wurde ich entscheidend von Dr. Cumme, Institut für Biochemie I der FSU Jena, unterstützt.

Bezüglich der Existenz einer unimolekularen Teilreaktion ergeben sich aus meinen Berechnungen keine neuen Aspekte im Vergleich zu den schon von Ménard und Mitarbeitern (1998) diskutierten Überlegungen. Ein unimolekularer Prozess ist zwar nicht prinzipiell auszuschließen aber wegen der dazu erforderlichen Konformationsänderungen des Zymogens, die bisher experimentell noch nie beobachtet werden konnten, eher unwahrscheinlich. Plausibler ist die Annahme, dass das Proenzym in zwei Konformationszuständen existiert, enzymatisch inaktiv und aktiv, letzterer aber nur zu einem extrem geringen Teil. Das Gleichgewicht könnte sich etwa wie beim Komplex aus Enzym und Propeptid einstellen. Damit gibt es immer eine minimale Konzentration an katalytisch wirksamen Proenzymmolekülen ( $E_0$ ) im Ansatz, deren Anzahl mit sinkenden pH steigt. Sie kollidieren mit zunehmender Temperatur immer häufiger mit ihrem Substrat, einem anderen Proenzymmolekül, und katalysieren dann sehr rasch dessen Spaltung. Ein eindeutiger Beweis eines unimolekularen Mechanismus wäre methodisch schwierig, denn wegen seines vernachlässigbaren Beitrages zur gesamten Reaktionsgeschwindigkeit ist er in klassischen Reaktionsansätzen nur in der frühesten Phase einer Autoprozessierungsreaktion erkennbar, dann wenn  $E$  noch fast Null ist und damit  $k_c \cdot E$  (vergl. Gl. 9) noch sehr klein bleiben. Denkbar wären allenfalls Experimente mit Festphasen-gekoppeltem Procathepsin L, ein solches Vorgehen ist aber bisher noch nicht beschrieben worden.

Wie schon zu Beginn des Kapitels bei der Auflistung der Funktionen von Proregionen erwähnt, sind Proenzyme (Mason et al. 1987, Nomura und Fujisawa 1997) bzw. Enzym-Propeptid-Komplexe (Körner in Vorbereitung, Pietschmann 2002) generell stabiler als die reifen Proteasen. Dieser Effekt könnte auf die Verminderung der intermolekularen Degradation durch die Inhibition der Proteaseaktivität zurückzuführen sein, oder er ist Folge einer Strukturstabilisierung. Da sowohl Inhibitoren als auch kleine synthetische Substrate als Enzym-stabilisierende Reagenzien gelten, scheint die Ursache in der Ausbildung eines langlebigeren Komplexes zu liegen (Turk et al. 1993).

Um die Stabilität unserer Cathepsin L-Präparation zu erhöhen, wurde der Einsatz des reversiblen Inhibitors MMTS erprobt (Smith et al. 1975). MMTS blockiert Sulfhydrylgruppen im aktiven Zentrum des Enzyms und verhindert so deren irreversible Inaktivierung durch Oxidation oder ähnliches. In der Vergangenheit wurden zu diesem Zweck auch Quecksilberionen eingesetzt, deren Wirkung durch EDTA Zusatz aufgehoben werden kann (Barrett und Kirschke 1981). Im Experiment (Abbildung 32) konnte ich zeigen, dass der Zusatz von 5 mM MMTS zur Stabilisierung des Enzyms bei regelmäßiger Verwendung der Enzymlösung, also bei regelmäßigem Auftauen und Einfrieren, beitragen kann. Die Stabilität von Cathepsin L ist

jedoch auch ohne MMTS ausreichend groß (Abbildung 31), um bei entsprechend vorsichtiger Handhabung, z.B. Portionierung der Enzymlösung und Auftauen von jeweils lediglich einer Portion, und Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  über einen längeren Zeitraum konstante Aktivität zu erhalten. Vermutlich ist es besser, die MMTS-haltigen Proben überhaupt nicht einzufrieren. Bei manchen Anwendungen könnte der MMTS-Zusatz stören, in diesen Fällen ist die portionierte Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eine etwa gleichwertige Alternative.

## Literaturverzeichnis

Abudula A. 2001. Identifizierung und funktionelle Analyse von 5'UTR-Spleissvarianten der mRNA des humanen Cathepsin L [Dissertation]. Jena: Medizinische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität.

Baricos WH, Cortez SL, Le QC, Wu LT, Shaw E, Hanada K, Shah SV. 1991. Evidence suggesting a role for cathepsin L in an experimental model of glomerulonephritis. Arch Biochem Biophys. 288(2):468-72.

Baricos WH, O'Connor SE, Cortez SL, Wu LT, Shah SV. 1988. The cysteine proteinase inhibitor, E-64, reduces proteinuria in an experimental model of glomerulonephritis. Biochem Biophys Res Commun. 155(3):1318-23.

Barrett AJ, Kembhavi AA, Brown MA, Kirschke H, Knight CG, Tamai M, Hanada K. 1982. L-trans-Epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. Biochem J. 201(1):189-98.

Barrett AJ, Kirschke H. 1981. Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. Methods Enzymol. 80 Pt C:535-61.

Betton JM, Chaffotte A. 2005. Recombinant protein folding and production. Med Sci (Paris). 21(6-7):613-7.

Billington CJ, Mason P, Magny MC, Mort JS. 2000. The Slow-Binding Inhibition of Cathepsin K by Its Propeptide. Bioch Biophys Res Comm, 276:924-929.

Brömme D, Nallaseth FS, Turk B. 2004. Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. Methods, 32(2):199-206.

Brömme D und Okamoto K. 1995. Human cathepsin O2, a novel cysteine protease highly expressed in osteoclastomas and ovary molecular cloning, sequencing and tissue distribution. J Biol Chem, 376(6):379-84.

Chapman RL, Kane SE, Erickson AH. 1997. Abnormal glycosylation of procathepsin L due to N-terminal point mutations correlates with failure to sort to lysosomes. *J Biol Chem*, 272(13):8808-16.

Clark ED, Schwarz E, Rudolph R. 1999. Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. *Meth Enzymol*. 309 : 217-36.

Cline J, Braman JC, Hogrefe HH. 1996. PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*. 24(18):3546-51.

Colella R, Jackson T, Goodwyn E. 2004. Matrigel invasion by the prostate cancer cell lines, PC3 and DU145, and cathepsin L+B activity. *Biotech Histochem*. 79(3-4):121-7.

Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT. 2003. *Current Protocols in Protein Science*. John Wiley & Sons.

Coulombe R, Grochulski P, Sivaraman J, Menardl R, Mort JS, Cygler M. 1996. Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *The EMBO Journal* vol.15 no.20 pp.5492-5503.

Dahl, S., Halkier, T., Lauritzen, C., Dolec, I., Pedersen, J., Turk, V. and Turk, B. (2001). Human recombinant dipeptidyl-peptidase I (Cathepsin C) can be activated by cathepsins L and S but not by autocatalytic processing. *Biochem*. 40, 1671-78

D'Alessio KJ, McQueney MS, Brun KA, Orsini MJ, Debouck CM. 1999. Expression in *Escherichia coli*, refolding, and purification of human procathepsin K, an osteoclast-specific protease. *Protein Expr Purif*. 15(2):213-20.

Dolinar M, Maganja DB, Turk V. 1995. Expression of full-length human procathepsin L cDNA in *Escherichia coli* and refolding of the expression product. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 376(6):385-8.

Drake FH, Dodds RA, James IE, Connor JR, Debouck C, Richardson S, Lee-Rykaczewski E, Coleman L, Rieman D, Barthlow R, Hastings G, Gowen M. 1996. Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J Biol Chem*, 271(21):12511-6.

Eder J, Rheinhecker M, Fersht AR. 1993. Folding of subtilisin BPN': role of the pro-sequence. *J Mol Biol*. 233(2):293-304.

Everts V, Hou WS, Rialland X, Tigchelaar W, Saftig P, Bromme D, Gelb BD, Beertsen W. 2003. Cathepsin K deficiency in pycnodysostosis results in accumulation of non-digested phagocytosed collagen in fibroblasts. *Calcif Tissue Int*. 73(4):380-6.

Fox T, de Miguel E, Mort JS, Storer AC. 1992. Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide. *Biochem*, 31(50):12571-6.

Frohlich E, Mohrle M, Klessen C. 2004. Cathepsins in basal cell carcinomas: activity, immunoreactivity and mRNA staining of cathepsins B, D, H and L. *Arch Dermatol Res*. 295(10):411-21. Epub 2004 Feb. 7.

Fujita Y, Nakata K, et al. 2000. "Novel mutations of the cathepsin K gene in patients with pycnodysostosis and their characterization." *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 85(1): 425-31.

Gelb BD, Shi GP, et al. 1996. Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science*. 273(5259): 1236-8.

Guay J, Falgout J, Ducret A, Percival MD, Mancini A. 2000. Potency and selectivity of inhibition of cathepsin K, L and S by their respective propeptides. *Eur J Biochem*, 267.

Hagemann S, Gunther T, Dannemark J, Lohmuller T, Bromme D, Schule R, Peters C, Reinheckel T. 2004. The human cysteine protease cathepsin V can compensate for murine cathepsin L in mouse epidermis and hair follicles. *Eur J Cell Biol*. 83(11-12):775-80.

Honey K, Benlagha K, Beers C, Forbush K, Teyton L, Kleijmeer MJ, Rudensky AY, Bendelac A. 2002. Thymocyte expression of cathepsin L is essential for NKT cell development. *Nat Immunol.* 3(11):1069-74.

Honey K, Nakagawa T, Peters C, Rudensky A. 2002. Cathepsin L regulates CD4<sup>+</sup> T cell selection independently of its effect on invariant chain: a role in the generation of positively selecting peptide ligands. *J Exp Med.* 195(10):1349-58.

Honey K, Rudensky AY. 2003. Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol.* 3(6):472-82.

Hou WS, Brömme D, Zhao Y, Mehler E, Dushey C, Weinstein H, Miranda CS, Fraga C, Greig F, Carey J, Rimoin DL, Desnick RJ, Gelb BD. 1999. Characterization of novel cathepsin K mutations in the pro and mature polypeptide regions causing pycnodysostosis. *J Clin Invest,* 103(5):731-8.

Inouye M. 1991. Intramolecular chaperone: the role of the pro-peptide in protein folding. *Enzyme.* 45(5-6):314-21.

Ishidoh K und Kominami E. 1994. Multi-step processing of procathepsin L in vitro. *FEBS Lett.* 352(3):281-4.

Ishidoh K und Kominami E. 1995. Procathepsin L degrades extracellular matrix proteins in the presence of glycosaminoglycans in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217:624-31.

Karrer KM, Peiffer SL, DiTomas ME. 1993. Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proc Natl Acad Sci,* 90(7): 3063-7.

Kaulmann G. 2004. The crystal structure of human procathepsin S wild type [Dissertation]. Jena: Medizinische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität.

Kawada A, Hara K, Kominami E, Hiruma M, Noguchi H, Ishibashi A. 1997. Processing of cathepsins L, B and D in psoriatic epidermis. *Arch Dermatol Res.* 289(2):87-93.

Kiefhaber T, Rudolph R, Kohler HH, Buchner J. 1991. Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology (N Y)*. 9(9):825-9.

Kirschke H, Barrett AJ, Rawlings ND. 1995. Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile*. 2(14):1581-643.

Kirschke H, Eerola R, Hopsu-Havu VK, Bromme D, Vuorio E. 2000. Antisense RNA inhibition of cathepsin L expression reduces tumorigenicity of malignant cells. *Eur J Cancer*. 36(6):787-95.

Kleint R. 2004. Analyse von Cathepsin K-Ligand-Wechselwirkungen: Vorarbeiten zur Untersuchung der Propeptid-katalysierten Faltung dieses Enzyms [Dissertation]. Jena: Medizinische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität.

Kopitar G, Dolinar M, Strukelj B, Pungercar J, Turk V. 1996. Folding and activation of human procathepsin S from inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*. 236(2):558-62.

Kraft CK. 2004. Die Cysteinpeptidasen Cathepsin B und Cathepsin L in Tumor- und Normalgeweben sowie tumorbefallenen- und unbefallenen Lymphknoten der Lunge. Markerenzyme für die lymphogene Metastasierung? [Dissertation]. Medizinische Fakultät der Universität Heidelberg. URL: <http://www.ub.uni-heidelberg.de/archiv/4529>

Kreusch S, Fehn M, Maubach G, Nissler K, Rommerskirch W, Schilling K, Weber E, Wenz I, Wiederanders B. 2000. An evolutionarily conserved tripartite tryptophan motif stabilizes the prodomains of cathepsin L-like cysteine proteases. *Eur J Biochem*, 267:2965-2972.

Lang TH, Willinger U, Holzer G. 2004. Soluble cathepsin-L: a marker of bone resorption and bone density? *J Lab Clin Med*. 144(3):163-6.

Li Y, Hu Z, Jordan F, Inouye M. 1995. Functional analysis of the propeptide of subtilisin E as an intramolecular chaperone for protein folding. Refolding and inhibitory abilities of propeptide mutants. *J Biol Chem*, 270(42):25127-32.



Linnevers CJ, McGrath ME, Armstrong R, Mistry FR, Barnes MG, Klaus JL, Palmer JT, Katz BA, Brömme D. 1997. Expression of human cathepsin K in *Pichia pastoris* and preliminary crystallographic studies of an inhibitor complex. *Prot Sci*, 6(4):919-21.

Liu J, Sukhova GK, Yang JT, Sun J, Ma L, Ren A, Xu WH, Fu H, Dolganov GM, Hu C, Libby P, Shi GP. 2005. Cathepsin L expression and regulation in human abdominal aortic aneurysm, atherosclerosis, and vascular cells. *Atherosclerosis*. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.05.012

Lombardi G, Burzyn D, Mundinano J, Berguer P, Bekinschtein P, Costa H, Castillo LF, Goldman A, Meiss R, Piazzon I, Nepomnaschy I. 2005. Cathepsin-L influences the expression of extracellular matrix in lymphoid organs and plays a role in the regulation of thymic output and of peripheral T cell number. *J Immunol*. 174(11):7022-32.

Mason RW. 1986. Species variants of cathepsin L and their immunological identification. *Biochem J*. 240(1):285-8.

Mason RW, Gal S, Gottesman MM. 1987. The identification of the major excreted protein (MEP) from a transformed mouse fibroblast cell line as a catalytically active precursor form of cathepsin L. *Eur J Biochem*, 248(2):449-54.

Mason RW, Green GD, Barrett AJ. 1985. Human liver cathepsin L. *Biochem J*. 226(1):233-41.

Mason RW, Massey SD. 1992. Surface activation of pro-cathepsin L. *Biochem Biophys Res Commun*. 189(3):1659-66.

Maubach G, Schilling K, Rommerskirch W, Wenz I, Schultz JE, Weber E, Wiederanders B. 1997. The inhibition of cathepsin S by its propeptide-specificity and mechanism of action. *Eur J Biochem*, 250(3):745-50.

McIntyre GF, Godbold GD, Erickson AH. 1994. The pH-dependent membrane association of procathepsin L is mediated by a 9-residue sequence within the propeptide. *J Biol Chem*. 269(1):567-72.

Ménard R, Carmona E, Takebe S, Dufour E, Plouffe C, Mason P, Mort JS. 1998. Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin L. Contribution of both intermolecular and unimolecular events in the processing of procathepsin L in vitro. *J Biol Chem.* 273(8):4478-84.

Muntener K, Willimann A, Zwicky R, Svoboda B, Mach L, Baici A. 2005. Folding competence of N-terminally truncated forms of human procathepsin B. *J Biol Chem.* 280(12):11973-80.

Muntener K, Zwicky R, Csucs G, Rohrer J, Baici A. 2004. Exon skipping of cathepsin B: mitochondrial targeting of a lysosomal peptidase provokes cell death. *J Biol Chem.* 279(39):41012-7.

Nägler DK, Zhang R, Nögler DK, Zhang R, Tam W, Sulea T, Purisima EO, Menard R. 1999. Human cathepsin X: A cysteine protease with unique carboxypeptidase activity. *Biochemistry.* 38(39):12648-54.

Niedergethmann M, Wostbrock B, Sturm JW, Willeke F, Post S, Hildenbrand R. 2004. Prognostic impact of cysteine proteases cathepsin B and cathepsin L in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas.* 29(3):204-11.

Nishimura F, Naruishi H, Naruishi K, Yamada T, Sasaki J, Peters C, Uchiyama Y, Murayama Y. 2002. Cathepsin-L, a key molecule in the pathogenesis of drug-induced and I-cell disease-mediated gingival overgrowth: a study with cathepsin-L-deficient mice. *Am J Pathol.* 161(6):2047-52.

Nissler K, Kreusch S, Rommerskirch W, Strubel W, Weber E, Wiederanders B. 1998. Sorting of non-glycosylated human procathepsin S in mammalian cells. *J Biol Chem,* 379(2):219-24.

Nomura T und Fujisawa Y. 1997. Processing properties of recombinant human procathepsin L. *Bioch Biophys Res Comm,* 230(1):143-6.

Nomura T, Fujishima A, Fujisawa Y. 1996. Characterization and crystallization of recombinant human cathepsin L. *Biochem Biophys Res Commun.* 228(3):792-6.

Ogino T, Kaji T, Kawabata M, Satoh K, Tomoo K, Ishida T, Yamazaki H, Ishidoh K, Kominami E. 1999. Function of the propeptide region in recombinant expression of active procathepsin L in *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo)*. 126(1):78-83.

Paczek L, Pazik J, Teschner M, Schaefer RM, Rowinski W, Szmidt J, Lao M, Abgarowicz K, Gradowska L, Morzycka-Michalik M, Heidland A. 1994. Human chronic kidney allograft rejection is accompanied by increased intraglomerular cathepsin B and L activity. *Transpl Int*. 7 Suppl 1:S311-3.

Pietschmann S, Fehn M, Kulmann G, Wenz I, Wiederanders B, Schilling K. 2002. Foldase function of the cathepsin S proregion is strictly based upon its domain structure. *J Biol Chem*, 383(9):1453-8.

Potts W, Bowyer J, Jones H, Tucker D, Freemont AJ, Millest A, Martin C, Vernon W, Neerunjun D, Slynn G, Harper F, Maciewicz R. 2004. Cathepsin L-deficient mice exhibit abnormal skin and bone development and show increased resistance to osteoporosis following ovariectomy. *Int J Exp Pathol*. 85(2):85-96.

Quraishi O, Storer AC. 2001. Identification of internal autoproteolytic cleavage sites within the prosegments of recombinant procathepsin B and procathepsin S. Contribution of a plausible unimolecular autoproteolytic event for the processing of zymogens belonging to the papain family. *J Biol Chem*. 276(11):8118-24.

Rasch D, Verdooren LR, Gowers JJ. 1999. *Grundlagen der Planung und Auswertung von Versuchen und Erhebungen*. München Wien: Oldenburg Verlag.

Ravanko K, Jarvinen K, Helin J, Kalkkinen N, Holtta E. 2004. Cysteine cathepsins are central contributors of invasion by cultured adenosylmethionine decarboxylase-transformed rodent fibroblasts. *Cancer Res*. 64(24):8831-8.

Reinheckel T, Hagemann S, Dollwet-Mack S, Martinez E, Lohmuller T, Zlatkovic G, Tobin DJ, Maas-Szabowski N, Peters C. 2005. The lysosomal cysteine protease cathepsin L regulates keratinocyte proliferation by control of growth factor recycling. *J Cell Sci*. 118(Pt 15):3387-95.

Rhode H, Schulze M, Cumme GA, Gohlert A, Blume E, Bublitx R, Schilling K, Horn A. 2000. Glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D of human serum--activity modulation by naturally occurring amphiphiles. *Biol Chem.* 381(5-6):471-85.

Riese RJ, Wolf PR, Bromme D, Natkin LR, Villadangos JA, Ploegh HL, Chapman HA. 1996. Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity.* 4(4):357-66.

Roche PA und Cresswell P. 1990. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature.* 345(6276):615-8.

Rudolph R, Böhm G, Lilie H, Jaenicke R. 1997. *Folding Proteins. Protein Function.* T. E. Creighton. New York: Oxford University Press.

Sandoval, I. V. and Bakke O. 1994. Targeting of membrane proteins to endosomes and lysosomes. [erratum appears in *Trends Cell Biol.* 1994 Oct;4(10):377]. *Trends in Cell Biology.* 4(8): 292-7.

Sarat G, de la Motte R et al. 1994. *Protease Assay Methods.* New York, Oxford University Press.

Sauter NK, Mau T, Rader SD, Agard DA. 1998. Structure of  $\alpha$ -lytic protease complexed with its pro region. *Nature.* 5(1998):945-50.

Schlabrakowski A. 2003. Spezifität der Inhibition von Cathepsin L- ähnlichen Cysteinproteasen mit ihren Propeptiden [Dissertation]. Medizinische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Sehmisch S. 2005. Untersuchung der Propeptid-katalysierten Faltung von Cathepsin K [Dissertation]. Medizinische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Shi GP, Sukhova GK, Kuzuya M, Ye Q, Du J, Zhang Y, Pan JH, Lu ML, Cheng XW, Iguchi A, Perrey S, Lee AM, Chapman HA, Libby P. 2003. Deficiency of the cysteine protease cathepsin S impairs microvessel growth. *Circ Res.* 92(5):493-500.

Shi GP, Villadangos JA, Dranoff G, Small C, Gu L, Haley KJ, Riese R, Ploegh HL, Chapman HA. 1999. Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity*, 2:197-206.

Smith SM, Gottesman MM. 1989. Activity and deletion analysis of recombinant human cathepsin L expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 264(34):20487-95.

Smith DJ, Maggio, ET, Kenyon GL. 1975. Simple alkanethiol groups for temporary blocking of sulfhydryl groups of enzymes. *Biochemistry*. 14(4):766-71.

Sohl JL, Jaswal SS, Agard DA. 1998. Unfolded conformations of alpha-lytic protease are more stable than its native state. *Nature*, 395(6704):817-9.

Tao K, Stearns NA, Dong J, Wu QL, Sahagian GG. 1994. The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. *Arch Biochem Biophys*, 311(1):19-27.

Taubert H, Riemann D, Kehlen A, Meye A, Bartel F, John V, Brandt J, Bache M, Wurl P, Schmidt H, Weber E. 2002. Expression of cathepsin B, D and L protein in juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmunity*. 35(3):221-4.

Timasheff SN, Arakawa T. 1997. Stabilization of protein structure by solvents. *Protein Structure*. T. E. Creighton. New York: Oxford University Press:349-364.

Tobbell DA, Middleton BJ, Raines S, Needham MR, Taylor IW, Beveridge JY, Abbott WM. 2002. Identification of in vitro folding conditions for procathepsin S and cathepsin S using fractional factorial screens. *Protein Expr Purif.* 24(2):242-54.

Tobin DJ, Foitzik K, Reinheckel T, Mecklenburg L, Botchkarev VA, Peters C, Paus R. 2002. The Lysosomal Protease Cathepsin L Is an Important Regulator of Keratinocyte and Melanocyte Differentiation During Hair Follicle Morphogenesis and Cycling. *Am J Pathol.* 160(5):1807-21.

Tolosa E, Li W, Yasuda Y, Wienhold W, Denzin LK, Lautwein A, Driessen C, Schnorrer P, Weber E, Stevanovic S, Kurek R, Melms A, Bromme D. 2003. Cathepsin V is involved in the degradation of invariant chain in human thymus and is overexpressed in myasthenia gravis. *J Clin Invest.* 112(4):517-26.

Troy AM, Sheahan K, Mulcahy HE, Duffy MJ, Hyland JM, O'Donoghue DP. 2004. Expression of Cathepsin B and L antigen and activity is associated with early colorectal cancer progression. *Eur J Cancer.* 40(10):1610-6.

Turk B, Dolenc I, Turk V, Bieth JG. 1993. Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L. *Biochemistry.* 32(1):375-80.

Turk V, Turk B, Turk D. 2001. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *The EMBO Journal.* pp 4629- 4633.

Turk, B., Turk, D. and Turk, V. (2000). Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Bioch. Biophys. Acta* 1477, 98-111

Vijayalakshmi J, Mukherjee MK, Graumann J, Jakob U, Saper MA. 2001. The 2.2 Å crystal structure of Hsp33: a heat shock protein with redox-regulated chaperone activity. *Structure,* 9(5):367-75.

Villadangos JA, Bryant RA, Deussing J, Driessen C, Lennon-Dumenil AM, Riese RJ, Roth W, Saftig P, Shi GP, Chapman HA, Peters C, Ploegh HL. 1999. Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev,* 172:109-20.

Visal S, Taylor MA, Michaud D. 1998. The proregion of papaya proteinase IV inhibits Colorado potato beetle digestive cysteine proteinases. *FEBS Letters,* 434:401-405.

Volkel H, Kurz U, Linder J, Klumpp S, Gnau V, Jung G, Schultz JE. 1996. Cathepsin L is an intracellular and extracellular protease in *Paramecium tetraurelia*. Purification, cloning, sequencing and specific inhibition by its expressed propeptide. *Eur J Biochem*, 238:198-206.

Wang B, Shi GP, Yao PM, Li Z, Chapman HA, Bromme D. 1998. Human cathepsin F. Molecular cloning, functional expression, tissue localization, and enzymatic characterization. *J Biol Chem*, 273(48):32000-8.

Wex T, Levy B, Wex H, Bromme D. 1999. Human cathepsins F and W: A new subgroup of cathepsins. *Biochem Biophys Res Comm*, 259(2):401-7.

Willis MS, Hogan JK, Prabhakar P, Liu X, Tsai K, Wei Y, Fox T. 2005. Investigation of protein refolding using a fractional factorial screen: a study of reagent effects and interactions. *Protein Sci*. Epub 2005 Jun 3.

Wolf, PR, Ploegh HL. 1995. How MHC class II molecules acquire peptide cargo: Biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11: 267-306.

Woycechowsky KJ, Hook BA, Raines RT. 2003. Catalysis of protein folding by an immobilized small-molecule dithiol. *Biotechnol Prog.* 19(4):1307-14.

Yamamoto Y, Watabe S, Kageyama T, Takahashi SY. 1999. Proregion of *Bombyx mori* cysteine proteinase functions as an intramolecular chaperone to promote proper folding of the mature enzyme. *Arch Insect Biochem Physiol*, 42(3):167-178.

Yu XH, Zhang XG, Li SJ, Wang SJ, Zhao G, Chen RZ, Yang YZ. 2005. The expression and significance of myocardial cathepsin L in dilated cardiomyopathy. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 44(7):495-8.

Zhu XL, Ohta Y, Jordan F, Inouye M. 1989. Pro-sequence of subtilisin can guide the refolding of denatured subtilisin in an intermolecular process. *Nature*. 339(6224):483-4.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben, herzlich bedanken. Insbesondere gilt mein Dank:

**Herrn Prof. Dr. B. Wiederanders** für die ausgesprochen freundliche Aufnahme am Institut, die ständige Gesprächsbereitschaft und die zahlreichen konstruktiven Vorschläge sowohl bei der Durchführung der Experimente als auch bei der Anfertigung der Dissertationsschrift.

**Herrn Dr. K. Schilling** für seine ausgezeichnete und herzliche Betreuung, seine besondere Hilfsbereitschaft und Geduld und die exzellente Anleitung sowohl bei den Experimenten als auch beim Verfassen der Arbeit.

**Frau A. Kreusch** für die sehr angenehme und humorvolle Betreuung, die vielfältige Unterstützung und ihr ausgesprochenes Interesse an allen Ergebnissen meiner Arbeit.

**Herrn Dr. Cumme** für die freundliche und kompetente Unterstützung bei mathematischen Fragestellungen.

Den anderen **Mitarbeitern des Instituts** für die stets angenehme und freundliche Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt **meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester Katharina, meinem Freund Sebastian sowie allen anderen Freunden** für ihre ständige Unterstützung im Hinblick auf diese Arbeit.



## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Anja Paul, geboren am 28.02.1983 in Gera, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. B. Wiederanders, Dr. K. Schilling, A. Kreusch,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwertige Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit den Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 11. November 2007

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Name:	Paul
Vorname:	Anja
Anschrift:	Schlegelstr. 4 07747 Jena
Geburtsdatum:	28.02.1983
Geburtsort:	Gera
Familienstand:	ledig

### **Schulbildung:**

09/1989 – 07/1993	Grundschule Gera
08/1993 – 07/2001	Friedrich-Schiller-Gymnasium Gera
	Abschluss: Abitur

### **Hochschulbildung:**

seit 09/2001	Medizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
08/2003	Ärztliche Vorprüfung
seit 11/2003	Promotion zum Thema: „Optimierung der präparativen Herstellung von rekombinantem humanem Cathepsin L“ am Institut für Biochemie der FSU Jena Betreuer: Prof. Dr. B. Wiederanders

Jena, den 11. November 2007